

**Aus dem Fachbereich Medizin der  
Philipps-Universität Marburg**

Prof. Dr. med. Matthias Ocker



**Molekulare und morphologische Analyse der  
Mitochondrienfunktion in einem Mausmodel des  
Fibromyalgiesyndroms**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

**Lisa Özel**

aus Gießen

Marburg an der Lahn, 2015

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am: 02.Juli 2015

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan:	Prof. Dr.med. Helmut Schäfer
Referent:	Prof. Dr.med. Matthias Ocker
Korreferent:	Prof. Dr. med. Frank Czubayko

*Meinem Vater gewidmet*

„Denn unser Wissen ist Stückwerk“.

1. Korinther 13 Vers 9

## Inhalt

Abbildungsverzeichnis.....	7
Tabellenverzeichnis.....	8
Abkürzungsverzeichnis.....	9
1. Zusammenfassung und Abstract.....	11
2. Einleitung.....	14
2.1. Definition, Symptomatik und Diagnose des FMS.....	14
2.2. Behandlungsansätze des FMS.....	16
2.3. Ätiologie und Pathogenese des FMS.....	17
2.4. Mitochondrien und ihre Bedeutung für den Zellstoffwechsel.....	19
2.5. Morphologische Veränderungen der Skelettmuskulatur und der Mitochondrien im Hinblick auf das FMS.....	20
2.6. Autophagie und ihr Stellenwert für den Zellstoffwechsel.....	21
2.7. Tiermodelle für das FMS.....	26
2.8. Fragestellung.....	27
3. Materialien und Methoden.....	28
3.1. Materialien.....	28
3.1.1. Geräte.....	28
3.2. Primer, Antikörper, Kits, Chemikalien, Reagenzien, Medien, Puffer, Lösungen und Verbrauchsmaterialien.....	31
3.3. Herkunft und Haltungsbedingungen der Versuchstiere.....	35
3.4. Methoden.....	35
3.4.1. Versuchstiergruppen und Behandlungsschema (ICS-Modell).....	35
3.4.2. Tötung der Versuchstiere und Gewinnung der Proben.....	36
3.4.2.1. Blutentnahme.....	36
3.4.2.2. Gewebepräparation.....	36
3.4.2.3. Mitochondrienisolation.....	37
3.4.3. Blutgasanalyse.....	38

3.4.4. Lactatdehydrogenase-Aktivität in mitochondrialen Proben .....	38
3.4.5. Histologische Untersuchungen .....	39
3.4.5.1. Einbettung .....	39
3.4.5.2. Herstellung von Paraffin-Schnittpräparaten .....	39
3.4.5.3. Hämatoxylin-Eosin- und PAS-Färbungen.....	39
3.4.5.4. Sarkomerlängen .....	40
3.4.5.5. Glykogengehalt.....	40
3.4.6. Proteinextraktion.....	40
3.4.6.1. Mitochondriale Extrakte.....	40
3.4.6.2. Gesamtzellextrakt.....	40
3.4.7. Proteinquantifizierung .....	41
3.4.8. Western Blot Analysen.....	41
3.4.9. RNA-Isolation und RNA-Quantifizierung.....	42
3.4.10. cDNA-Synthese.....	43
3.4.11. Quantitative Polymerase Ketten Reaktion .....	43
3.4.12. Immunhistochemie .....	44
3.4.13. Transmissionselektronenmikroskopie .....	46
3.4.14. Statistische Auswertung .....	46
4. Ergebnisse .....	47
4.1. Auswertung der Blutgasanalysen .....	47
4.2. Lichtmikroskopische Untersuchungen des Muskelgewebes und der Sarkomerlänge in C57BL/6JMäusen.....	48
4.3. Metabolische Veränderungen in C57BL/6J Mäusen unter dem Einfluss intermittierendem Kältestresses .....	51
4.3.1. Messung der Lactatdehydrogenase-Aktivität in mitochondrialen Proben von C57BL/6J Mäusen	
52	
4.3.2. Glykogengehalt in Muskel- und Leberpräparaten von C57BL/6J Mäusen.....	53
4.4. Analyse der Expression von COQ10 und COX4I1 im ICS-Mausmodell.....	56
4.4.1. Verteilung und Expression von COQ10B und COX4I1.....	57

4.5.	Ultrastrukturelle Unterschiede in Muskelpräparaten von ICS- und Kontrolltieren.....	60
4.6.	Analyse von Autophagie-spezifischen Markern in Gewebeproben von C57BL/6J Mäusen .....	63
4.6.1.	Expression von Map1lc3b und Becn1 .....	63
4.6.2.	Proteinverteilung von Map1lc3b und p62 .....	65
4.7.	Immunhistochemische Analyse der MAP1LC3B-Verteilung im Muskelgewebe von C57BL/6J Mäusen .....	67
5.	Diskussion .....	70
5.1.	Zu den Methoden der Arbeit .....	70
5.2.	Veränderungen metabolischer Parameter durch intermittierenden Kältestress .....	73
5.3.	Variabilität in der Expression spezifischer Enzyme durch mitochondriale Degradationsvorgänge.....	76
5.4.	Beurteilung morphologischer Veränderungen in der Skelettmuskulatur .....	79
5.5.	Bedeutung autophagischer Prozesse für das FMS und ihre Entstehung durch intermittierenden Kältestress.....	81
5.6.	Ausblick .....	83
7.	Tabellarischer Lebenslauf .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
8.	Verzeichnis der akademischer Lehrer .....	91
9.	Danksagung.....	92
10.	Ehrenwörtliche Erklärung .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der typischen Lokalisation der „Tender Points“ .....	15
Abbildung 2: Schema der sozialen, biologischen und neurohormonalen Zusammenhänge beim FMS. .....	17
Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines Mitochondriums und seiner Innenstruktur.....	19
Abbildung 4: Die verschiedenen Arten von Autophagie. ....	22
Abbildung 5: Der molekulare Mechanismus der Makroautophagie. ....	24
Abbildung 6: Versuchstiergruppen.....	35
Abbildung 7: Lichtmikroskopische Aufnahmen HE-gefärbter Muskelpräparate. ....	49
Abbildung 8: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Sarkomerstrukturen. ....	50
Abbildung 9: Statistische Auswertung der Sarkomerlängen in Muskelpräparaten. ....	51
Abbildung 10: LDH-Aktivität in mitochondrialen Extrakten männlicher C57BL/6J Mäusen. ....	52
Abbildung 11: LDH-Aktivität in mitochondrialen Extrakten weiblicher C57BL/6J Mäusen.....	53
Abbildung 12: Lichtmikroskopische Aufnahmen PAS-gefärbter Muskelpräparate.....	54
Abbildung 13: Quantifizierung des Glykogengehaltes in Muskelpräparaten. ....	54
Abbildung 14: Lichtmikroskopische Aufnahmen PAS-gefärbter Leberpräparate. ....	55
Abbildung 15: Quantifizierung des Glykogengehaltes in Leberpräparaten. ....	56
Abbildung 16: Mittlere Expressionswerte von <i>Coq10b</i> .....	57
Abbildung 17: Mittlere Expressionswerte von <i>Cox4i1</i> . ....	58
Abbildung 18: Western Blots für COQ10B und COX4I1.....	59
Abbildung 19: Densitometrische Auswertung der Western Blots von COQ10B und COX4I1. ....	59
Abbildung 20: Repräsentative Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) . ....	60
Abbildung 21: Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) von Kontroll- und ICS-Tieren im Vergleich. .....	61
Abbildung 22: Darstellung mitophagischer Abläufe. ....	62
Abbildung 23: Mittlere Expression von <i>Map1lc3b</i> . ....	64
Abbildung 24: Mittlere Expression von <i>Becn1</i> . ....	65
Abbildung 25: Western Blots für MAP1LC3B, SQSTM1/ p62 und GAPDH (Ladekontrolle).....	66
Abbildung 26: Densitometrische Auswertung der Western Blots von MAP1LC3B und SQSTM1/p62. ....	66
Abbildung 27: Lichtmikroskopische Aufnahmen immunhistochemisch gefärbter Muskelpräparate männlicher und weiblicher C57BL/6J Mäuse. ....	68
Abbildung 28: Quantifizierung immunhistochemisch gefärbter Muskelpräparate. ....	69

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Unterschiede zwischen Makro- und Mikroautophagie. ....	23
Tabelle 2: Länge der Zyklen für die cDNA-Synthese.....	43
Tabelle 3: Eingesetzte Mengen an Reagenzien für den Master Mix.....	44
Tabelle 4: Länge der Zyklen bei den durchgeführten qRT-PCR.....	44
Tabelle 5: Blutgasanalyse aus Blutproben von C57BL/6J Mäusen. ....	48



## Abkürzungsverzeichnis

APAs	Antipolymer Antikörper
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
<i>Atg-Proteins</i>	autophagy-related proteins
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BECN 1	BECLIN 1
BSA	Bovines Serum Albumin
CBT	<i>Cognitive Behavioral Therapy</i>
cDNA	<i>complementary</i> DNA
COQ10	Coenzym Q 10
COX4I1	Cytochrom –c-Oxidase 4I1
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	<i>et alii</i> (and others)
FMS	Fibromyalgiesyndrom
HCV	Hepatitis-C-Virus
HE- Färbung	Hämatoxylin- Eosin- Färbung
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPA	Hypothalamus-Hypophysen-Achse
h	<i>hour</i> (Stunde)
ICS	<i>intermittent cold stress</i>
ICF	<i>International Classification of Functionality, Disability and Health</i>
MAP1LC3	Mikrotubulus- assoziiertes Protein 1 <i>light chain</i> 3
NSAID	<i>Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs</i>
PAGE	<i>Polyacrylamide- gel electrophoresis</i>

PAS	präautophagosomale Struktur
PAS- Färbung	<i>periodic acid-Schiff- Färbung</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
rCBF	retrograder zerebraler Blutfluss
ROS	reaktive oxygen Spezies
rpm	<i>Rounds per minute</i>
rTMS	repetitive transkraniale magnetische Stimulation
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	<i>Real time-quantitative polymerase chain reaction</i>
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i>
SQSTM1/p62	<i>Sequestosome 1/p62</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
Tris	Tris-hydroxy-ethyl- aminomethan
ZNS	zentrales Nervensystem

## 1. Zusammenfassung und Abstract

### *Zusammenfassung*

Das Fibromyalgiesyndrom (FMS) stellt eine generalisierte Tendomyopathie dar und ist beim Menschen durch großflächige, vorzugsweise muskuläre und chronische Schmerzen von mindestens drei Monaten Dauer gekennzeichnet. Die Ursache und Ätiopathogenese dieser Erkrankung sind nach wie vor unbekannt und die Diagnosestellung erfolgt klinisch anhand von Klassifikationskriterien. Die Behandlung ist symptomatisch und führt nicht zu einer Ausheilung der Erkrankung.

Das intermittierende Kältestressmodell (ICS-Model) von Nishiyori *et al.* gilt als etabliertes Mausmodell zur Induktion von fibromyalgie-ähnlicher Schmerzsymptomatik. Auf der Basis muskulärer und mitochondrialer Veränderungen bei Patienten mit FMS, wurden in der vorliegenden Arbeit Effekte des intermittierenden Kältestresses auf molekularer und morphologischer Ebene in C57BL/6J Mäusen untersucht. Dazu wurden jeweils 9 männliche und 9 weibliche Mäuse nach dem ICS-Model behandelt und mit Kontrollgruppen der gleichen Anzahl an Tieren verglichen.

Aufgrund von aus der Literatur bekannten metabolischen Veränderungen im Rahmen des FMS, wurden verschiedene Parameter untersucht. Eine Blutgasanalyse zeigte in den ICS-Tieren Unterschiede hinsichtlich Parameter wie CO<sub>2</sub>, Na<sup>+</sup>, Glucose, Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, MetHb und O<sub>2</sub> auf. Lichtmikroskopisch zeigten männliche ICS-Tiere einen geringfügig niedrigeren Glykogenanteil im Muskelgewebe und eine signifikante Reduktion desselben im Lebergewebe. Die LDH-Aktivität in mitochondrialen Proben männlicher und weiblicher ICS-Tiere war im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht.

Um Aufschluss über den Einfluss des Kältestresses auf die mitochondriale Funktion zu gewinnen, wurde die Expression des Coenzyms Q10B (COQ10B) und der Cytochrom-c-Oxidase 4 (COX4I1) untersucht. Mittels qRT-PCR konnte gezeigt werden, dass weibliche ICS-Tiere eine erhöhte Expression von *Coq10b* auf Transkriptionsebene aufwiesen. Die Expression des *Cox4i1*-Transkriptes zeigte bei den männlichen ICS-Tieren eine signifikante Erniedrigung. Des Weiteren konnte in mitochondrialen Proteinproben eine verminderte Expression von COQ10B als auch COX4I1 festgestellt werden. Ebenso wie in der Literatur, zeigten elektronenmikroskopische Analysen deutliche Anzeichen ablaufender autophagischer Prozesse, die wiederum durch molekularbiologische Verfahren verifiziert wurden. qRT-PCR-Analysen zeigten in den ICS-Tieren signifikant erhöhte Expressionen der Autophagie-relevanten Gene *Map1lc3b* (mikrotubulus- assoziiertes Protein 1 light chain 3 b) und *Beclin1* (*Becn1*) an. Im Muskelgewebe von männlichen ICS-Tieren konnte densitometrisch eine Erhöhung von SqSTM1/p62- Protein (p62) gezeigt werden. Außerdem

wies MAP1LC3B immunhistochemisch eine deutlich aggregierte Distribution in den ICS-Tieren auf, was wiederum für das vermehrte Vorkommen von Autophagosomen im Rahmen der Autophagie spricht.

Die durchgeführte Arbeit schafft erste Einblicke hinsichtlich der Auswirkungen intermittierenden Kältestresses auf den Stoffwechsel und die Zellfunktion von C57BL/6J Mäusen und gibt Hinweise auf die Bedeutung autophagischer Prozesse sowie mitochondrialer und metabolischer Veränderungen im Muskelgewebe.

## Abstract

Fibromyalgia syndrome is a generalized tendomyopathy that is characterized by widespread, particularly muscular and chronic pain of at least three months duration. The cause and pathogenesis of FMS are still unknown and diagnosis is clinically determined in accordance with classification criteria. The treatment is entirely symptomatic and does not lead to recovery from this disease.

The intermittent cold stress model (ICS-model) from Nishiyori *et al.* induces a fibromyalgia-like pain syndrome in mice. On the basis of muscular and mitochondrial changes in patients with FMS syndrome, the present study analysed the effects of intermittent cold stress on molecular and morphologic levels in C57BL/6J mice. Therefore 9 male and 9 female mice were exposed to ICS according to the protocol of the model and compared to a control group of the same number of mice.

Due to metabolic changes described in patients with FMS, different parameters were examined. Blood gas analysis showed differences concerning different parameters as CO<sub>2</sub>, Na<sup>+</sup>, Glucose, Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, MetHb and O<sub>2</sub> in ICS mice. In terms of light microscopy, a reduction of glycogen content in muscle and liver tissue was shown in male ICS-mice only. LDH-activity of mitochondrial samples was higher in ICS-mice.

To indicate whether ICS has an impact on mitochondrial function, the expression of COQ10B and COX4I1 analyzed. qRT-PCR analysis showed a higher expression of *Coq10b* transcript in female ICS-mice. Male ICS-mice showed a significant lower expression of *Cox4i1* transcript. Moreover, Westernblotting implied a reduction of COQ 10B and COX4I1 protein.

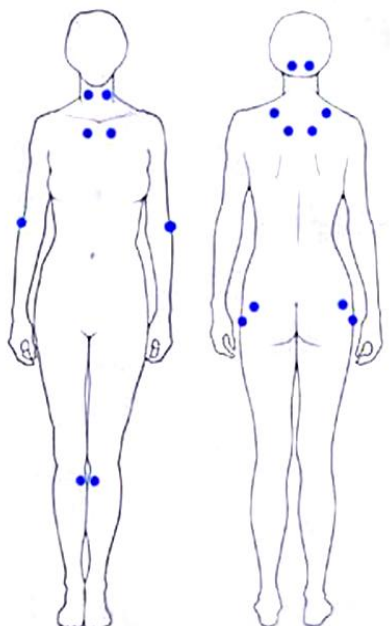
Compliant with literature, electron micrographs of muscle tissue showed clear evidence of autophagic processes that were verified on molecular level. Thereby, significant higher expressions of the autophagy-specific genes *Map1lc3b* and *Becn1* was detected in ICS-mice by qRT-PCR analysis. On protein level, a higher expression of SqSTM1/p62 could be perceived in mice exposed to ICS. Furthermore, ICS-mice showed an aggregated distribution of MAP1LC3B- protein in immunohistochemistry, which indicates augmented incidence of autophagosomes within autophagy.

The conducted work accomplishes first insights into effects of ICS on metabolism and cell function of C57BL/6J mice and indicates the relevance of autophagic processes as well as mitochondrial and metabolic variances in muscle tissue.

## 2. Einleitung

### 2.1. Definition, Symptomatik und Diagnose des FMS

Das FMS zählt zu den chronischen, nicht entzündlichen Schmerzerkrankungen, die vorzugsweise mit Schmerzen in myotendinösen Bereichen mehrerer verschiedener Körperregionen sowie mit vegetativen Begleitsymptomen einhergeht. Das Wort Fibromyalgie leitet sich mit seinen drei Bestandteilen aus dem lateinischen und griechischen Sprachgut ab. *Fibro* kommt vom lateinischen *fibra* und bedeutet „Faser“. *My* beziehungsweise *myo* leitet sich von dem griechischen Begriff *myos* „Muskel“ ab und *algie*, ebenfalls aus dem Griechischen von *algos* und bedeutet „Schmerz“. Die Diagnosestellung gestaltet sich schwierig, da sich viele Fälle des FMS nicht über eine standardisierte Reihe an diagnostischen Kriterien darbieten. Aufgrund der Tatsache, dass keine absoluten und definitiven diagnostischen Kriterien gelten, die universell anwendbar sind, wird die Diagnose häufig per Ausschlussdiagnose gestellt [1]. Dennoch sollten bei der Annahme eines FMS stets auch die relativ große Anzahl potentieller Diagnosen beachtet werden, um eine Fehldiagnose möglichst zu vermeiden. Dabei sind die wichtigsten Differentialdiagnosen, die man in jedem Fall bei Verdacht auf FMS ausschließen sollte psychosomatische Erkrankungen, Hypothyroidismus, rheumatoide Arthritis, Nebennierendysfunktionen und das Multiple Myelom [2]. Obwohl die meisten der Symptome eines FMS sehr unspezifisch sind, werden die drei Symptome Schmerz, Ermüdung und Schlafstörungen von fast jedem Patienten angegeben [3]. Ebenso ist es wichtig, auf den Schmerzcharakter zu achten, der sich bei dem FMS als diffus, multifokal, tief, nagend oder gar brennend äußert und sich damit im Vergleich von der Schmerzsymptomatik bei entzündlicher Genese unterscheidet. Zudem sollten auch zusätzliche Symptome wie zum Beispiel Gewichtsveränderungen, Morgensteifigkeit, Reizdarmsyndrom, kognitive Störungen, Kopfschmerzen, Kälte- oder Wärmeintoleranz, Reizblase, Restless-Legs-Syndrom oder das Raynaud-Syndrom beachtet werden, da diese gehäuft im Rahmen des FMS auftreten können [4]. Beim FMS sind muskuloskeletale und neurologische Untersuchungen sowie auch Labor- und Blutuntersuchungen im Regelfall unauffällig [5]. Im Jahre 1990 wurden vom *American College of Rheumatology* Klassifikationskriterien festgelegt, mit deren Hilfe klinisch eine Diagnose gestellt werden kann [6]. Diese Kriterien setzen voraus, dass für ein FMS zum einen ein großflächiger muskuloskeletaler Schmerz über einen Zeitraum von mehr als drei Monaten besteht und zum anderen eine schmerzhaft palpable Palpation an mindestens elf von insgesamt achtzehn sogenannten „*tender points*“ besteht. „*Tender points*“ sind Druckpunkte an definierten Muskel-Sehnen-Ansatzpunkten, an welchen durch eine standardisierte Druckstärke (ca. 4kg) Schmerzen ausgelöst werden können (*Abbildung 1*).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der typischen Lokalisation der „Tender Points“. Übernommen von Mayo Foundation for medical education and research [7].

Zusätzlich existiert seit 2008 eine S3-Leitlinie, die 2012 überarbeitet wurde [8]. Diese interdisziplinären Richtlinien sollen die Versorgung und Behandlung von Fibromyalgie-Patienten verbessern und unterscheiden im Gegensatz zu den Klassifikationskriterien zusätzlich zwischen Haupt- und Nebendiagnosen des FMS. Zu den Hauptdiagnosen gehören chronische Schmerzen verschiedener Körperregionen, andauernde Müdigkeit, körperliche Schwäche einhergehend mit genereller Erschöpfung und Schlafstörungen. Dabei treten die chronischen Schmerzen vermehrt an bestimmten Körperregionen, wie z.B. dem Rücken, Nacken und Brustkorb, aber auch an den Gelenken der Arme und Beine auf. Gemäß der Leitlinie, müssen diese Symptome mindestens drei Monate vorliegen. Als Nebendiagnosen werden Kopfschmerzen, Schwellungsgefühle an Händen, Füßen und Gesicht, Morgensteifigkeit, Reizdarm, Ängstlichkeit und Depressivität beschrieben. Zudem zählen auch eine Überempfindlichkeit der Schleimhäute und eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Geräuschen, Licht und Kälte zu den beschriebenen Nebendiagnosen des FMS in der S3-Leitlinie [8].

Obwohl die Klassifikationskriterien von 1990 bei der Diagnosestellung, nicht zuletzt aufgrund der dadurch teilweise ermöglichten Standardisierung, von großem Nutzen waren, wurden sie schnell kritisiert. Vor allem die Tatsache, dass zur Diagnosestellung die Begutachtung von „*tender points*“ herangezogen wurde, wurde in Frage gestellt [9, 10]. Somit wurden im Jahre 2010 neue Kriterien vom *American College of Rheumatology* (ACR) aufgestellt, die unter anderem einen *widespreadpain index* beinhaltet, der für die Beurteilung schmerzhafter Körperregionen notwendig ist sowie eine sogenannte *symptom severity scale* einschließt, die

den Schweregrad von kognitiven Störungen, Schlafstörungen und anderen somatischen Symptomen erfassen soll. Auch diese Kriterien wurden bereits modifiziert und sollen mittlerweile im Vergleich zu den ACR Kriterien von 1990 als Methode der vereinfachten Diagnosestellung beim FMS dienen und dabei von der Spezifität und Sensitivität nah an die ursprünglichen Kriterien der ACR von 1990 herankommen [11]. Aufgrund der Komplexität des FMS und der großen Variabilität an Erscheinungsformen, die teilweise auch durch die vielen verschiedenen mit dem FMS assoziierten Erkrankungen zustanden kommen, gibt es einige Forschungsgruppen, die eine Unterteilung des FMS in verschiedene Untergruppen befürwortet. Dies soll den Umgang mit der Erkrankung, vor allem auch im Hinblick auf Erfordernis heterogener Therapien erleichtern. Dennoch gibt es in der Einteilung des FMS in verschiedene Subgruppen noch keine einheitlich anerkannte Methode, sodass immer noch viele Forschungsansätze dieser Herausforderung nachgehen [12].

## 2.2. Behandlungsansätze des FMS

Da es sich bei dem FMS um eine chronische, bisher nicht heilbare Erkrankung handelt, ist es das Ziel der Behandlung eine Linderung der Schmerzsymptomatik zu erzeugen. Die internationale Klassifikation der Funktionsfähigkeit, Behinderung und Gesundheit (ICF) besagt, dass bei der Behandlung von chronischen Erkrankungen die Körperfunktionen (biologische Ebene), die Personenfaktoren (psychologische Ebene) und die Umweltfaktoren (soziale Ebene) berücksichtigt werden sollten. Das FMS betreffend sind alle diese Ebenen von Bedeutung, da viele der vorhandenen Symptome mit Umwelt- oder erblichen Faktoren in Verbindung gesetzt werden können. Aus diesem Grunde wird beim FMS ein multimodales Therapieregime empfohlen, welches sowohl nicht-pharmakologische Schmerzmanagement-Strategien als auch eine Medikation vorsieht.

Dabei gestaltet sich die Einstellung einer Therapie sehr schwierig, da der Leidensdruck der Patienten hoch ist und zudem eine interdisziplinäre Kooperation notwendig ist. Die Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) hat Empfehlungen für verschiedene Therapiemöglichkeiten ausgesprochen. Dabei galt der höchste Grad an Empfehlung für aerobes Training und Krafttraining, für kognitive Verhaltenstherapie (CBT), für eine medikamentöse Therapie mit Amitriptylin und generell für eine Mehrkomponenten-Therapie. Zur medikamentösen Therapie des FMS stehen verschiedene Substanzen zur Verfügung, wobei prinzipiell von der Gabe sowohl nicht-steroidaler Antiphlogistika (NSAIDs) sowie Ibuprofen und Naproxen als auch der Verwendung von Kortikosteroiden abgeraten wird [13, 14]. Auch Opiode zeigen keine vernehmbare Wirkung in der Therapie des FMS [13, 15]. Eine wesentliche Verbesserung

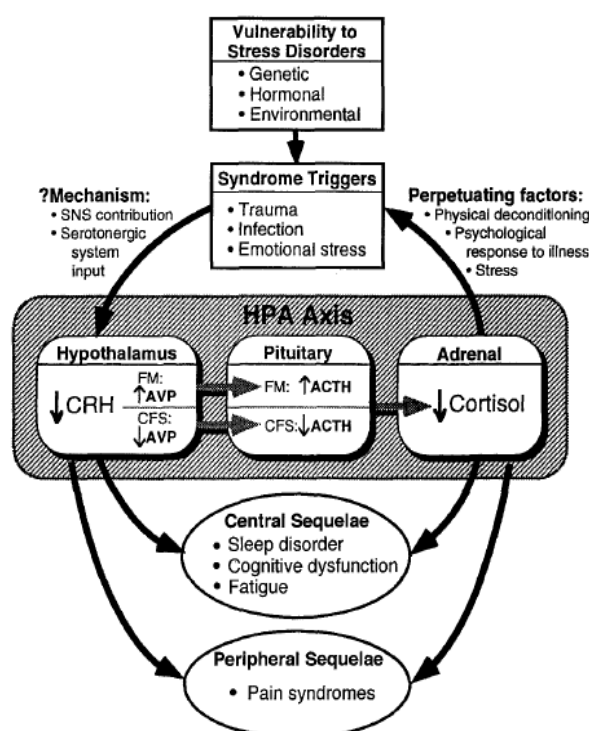


der Symptomatik wurde bei der Anwendung von Antidepressiva und neuromodulierenden Antiepileptika wahrgenommen.

Die nichtpharmakologische Behandlung spielt in der Therapie des FMS eine entscheidende Rolle, da sie neben der direkten Symptomverbesserung auch den Zweck der Verhaltensmodulation und der besseren Selbstwirksamkeit des Patienten bewirken soll. Die leitliniengerechte Behandlungsansätze beinhalten dabei Empfehlungen zur Ausübung von Ausdauertraining von geringer bis mittlerer Intensität. Ein sehr wichtiger Stellenwert wird auch der kognitiven Verhaltenstherapie und Psychotherapie beigemessen [16, 17]. Dagegen sollte laut Leitlinien ein intensives muskuläres Training sowie Massage vermieden werden, da diese zu einer Verschlechterung der Symptomatik führen können.

### 2.3. Ätiologie und Pathogenese des FMS

Ätiologie und Entstehungsmuster des FMS sind noch immer ungeklärt und werden kontrovers diskutiert. Im Vordergrund der Diskussionen stehen sowohl psychische und soziale Faktoren, als auch vor allem biologische Aspekte, die im Hinblick auf die Prädisposition, Auslösung und Chronifizierung der Erkrankung eine Rolle spielen könnten. Einen Überblick über die verschiedenen Zusammenhänge verschafft (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Schema der sozialen, biologischen und neurohormonalen Zusammenhänge beim FMS.**

Interaktionen der HPA-Achse mit ätiopathogenetischen Mechanismen des FMS. Die Abbildung veranschaulicht, dass niedrige CRH- und Kortisol-Werte zu einer zentralen und peripheren Manifestation der Erkrankung führen können und zudem die Aktivität der HPA-Achse weitere Faktoren beeinflusst, die zu der Manifestation der Erkrankung beitragen könnten. Übernommen aus Crafford *et al.* [18].

Grundsätzlich scheinen psychiatrische Erkrankungen auf unterschiedliche Weise zum Pathomechanismus des FMS beizutragen, sodass die Prävalenz solcher Erkrankungen unter Fibromyalgie-Patienten höher zu sein scheint, als unter Patienten die an anderen rheumatischen Erkrankungen leiden [19]. Dabei sind die häufigsten Beschwerden, die gemeinsam mit dem FMS auftreten Ängstlichkeit, Somatisierung, Panikstörungen, posttraumatische Belastungsstörungen und vor allem Depression [20-23].

Im Blickfeld der biologischen Faktoren stehen genetische Prädisposition, Störungen spezifischer, vor allem Neurohormoneller-Achsen sowie Schwankungen bestimmter Transmitter-Konzentrationen. Eine familiäre Häufung konnte durch einige klinische Studien bereits nachgewiesen werden [24, 25]. Neben Aspekten der Erziehung und damit einhergehend psychosozialen Faktoren, scheinen genetische Prädispositionen ebenfalls eine Rolle zu spielen [26, 27].

Da das FMS auch als Stress-assoziierte Erkrankung angesehen wird, wird eine Mitwirkung des neuroendokrinen Systems und des autonomen Nervensystems in der Pathogenese ebenfalls vermutet. Als sogenannte „menschliche Stress-Achse“, steht dabei besonders die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse (HPA-Achse) im Mittelpunkt [28]. Hinsichtlich des autonomen Nervensystems gibt es einige Studien, die zeigen, dass bei Patienten, die an einem FMS leiden, dass sympathische Nervensystem eine persistente Hyperaktivität aufweist, im Gegensatz dazu aber auf Stress eine Hypoaktivität zeigt [29, 30]. Damit könnten auch einige klinische Symptome des FMS, wie zum Beispiel Müdigkeit, Schlafstörungen, Ängstlichkeit oder das Reizdarmsyndrom erklärt werden [31].

Durch zahlreiche Studien wurde ebenfalls eine Störung in der zentralen Schmerzverarbeitung eruiert. Dabei soll es unter anderem zur verstärkten Antwort auf Stimulationen kommen, die über das zentrale Nervensystem (ZNS) vermittelt werden [32]. Ein weiterer Mechanismus, der auf zentraler Ebene vermutlich eine Rolle spielen könnte, schließt die zentralen deszendierenden hemmenden Bahnen ein, die die Schmerzantwort des Rückenmarks auf dolente Reize moduliert. Bei Patienten, die an einem FMS leiden, zeigen sich Veränderungen dieser Bahnen in Richtung einer dysfunktionalen und verminderten zentralen Hemmung peripherer Reize, was eine Exazerbation der zentralen Sensibilisierung begünstigen würde [33-35]. Des Weiteren gibt es Studien, die eine Mitwirkung von verschiedenen Neurotransmittern, wie Serotonin [36], bei der Entwicklung der zentralen Sensibilisierung hinsichtlich des FMS in Erwägung ziehen. Weitere Neurotransmitter, deren Beteiligung vermutet wird, sind zum größten Teil Peptide des endogenen Opioid-Systems, wie zum Beispiel Norepinephrin [37], Dopamin [38, 39], Substanz P [40] und Endorphine [41, 42]. Diese Peptide scheinen zwar bei Patienten mit FMS in höheren Konzentrationen vorhanden zu sein, aber dennoch nicht in der Lage zu sein, ihre eigentliche Funktion als Schmerzmodulatoren zu erfüllen. Dieses Phänomen könnte die

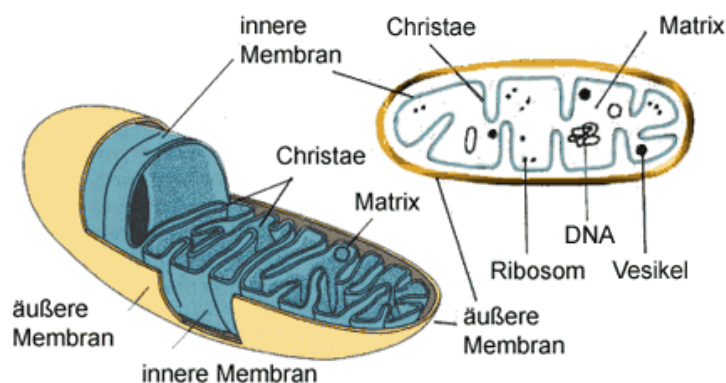
reduzierte Wirksamkeit von exogenen Opioiden in der Therapie des FMS erklären [31]. Ferner wird auch angenommen, dass Viren, wie zum Beispiel HCV, HIV und Parvovirus [43-45] ebenso wie einige Arten von Bakterien, insbesondere Borellien [46], an der Pathogenese der Fibromyalgie beteiligt sein könnten. Allerdings muss auch hier betont werden, dass es keinen sicheren und direkten kausalen Zusammenhang gibt und dass in der Mehrzahl der Fälle keiner dieser Faktoren als Trigger-Faktor des FMS anzunehmen ist [47, 48].

Alle diese genannten Ergebnisse und Ursachenerklärungen sind jedoch mehrheitlich unspezifisch und lassen sich in einigen Fällen auch bei anderen chronischen Schmerzerkrankungen nachweisen. Damit bleibt trotz dieser verschiedenen Ansätze die Ursache-Wirkung-Beziehung des FMS weithin unklar.

## 2.4. Mitochondrien und ihre Bedeutung für den Zellstoffwechsel

Mitochondrien sind semi-autonome Zellorganellen, die maternal vererbt werden und durch Wachstum und Sprossung entstehen. Der Begriff *Mitochondrion* leitet sich aus dem altgriechischen von *mítos* „Faden“ und *chóndros* „Korn“ ab. Sie sind in etwa 0,2- 1,5 µm groß und treten in allen Eukaryoten, nicht aber in Prokaryoten auf und sind als „Kraftwerke“ der Zelle an der Bildung von Adenosintriphosphat beteiligt [49].

Mitochondrien zeigen die Aufteilung in fünf unterschiedliche Kompartimente bestehend aus der äußeren und inneren Membran, die durch den Intermembranraum getrennt werden, die Cristae und die Matrix, die den Raum innerhalb der inneren Membran darstellt (*Abbildung 3*).



**Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines Mitochondriums und seiner Innenstruktur.**

Die Abbildung stellt den Aufbau eines Mitochondriums samt beinhaltenden Strukturen dar. [50]

Die äußere Mitochondrienmembran umschließt das Mitochondrium komplett und ermöglicht über Proteinkanäle, gemeinsam mit dem Intermembranraum, den Stoffaustausch von Molekülen und Ionen zwischen Mitochondrien und dem Zytosol. Der Intermembranraum enthält zusätzlich Enzyme, die unter ATP-Verbrauch die Phosphorylierung von Nukleotiden vornehmen können

Mitochondrien können Einstülpungen der inneren Membran aufweisen. Abhängig von der Beschaffenheit dieser Einstülpungen, werden der Tubuli-Typ, der Sacculi-Typ und der Cristae-Typ unterschieden. Die Matrix enthält die mitochondriale DNA, Ribosomen und Enzyme des Citratzyklus und der Fettsäureoxidation.

In den Mitochondrien laufen zahlreiche sehr essentielle Funktionen für den Zellmetabolismus ab, darunter unter anderem der Citratzyklus, der Fettsäureabbau ( $\beta$ -Oxidation) und nicht zuletzt die Energiegewinnung über die Atmungskette. Durch beispielsweise undichte Stellen in der Atmungskette oder anderen Schäden der Mitochondrien, kann die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) bewirkt werden und folglich zu oxidativem Stress der Zelle führen. Oxidativer Zellstress wiederum kann zelluläre Funktionsabläufe auf unterschiedlichste Weise beeinträchtigen und zum Zelltodführen [51].

Zwei für die funktionale Integrität der Mitochondrien unabdingbare Enzymkomplexe sind zum einen das Coenzym Q10 (COQ10) und zum anderen die Cytochrom-c-Oxidase 4 (COX4I1), die beide Komplexe innerhalb der Atmungskette darstellen.

COQ10 ist ein essentieller Elektronen- und Protonenüberträger zwischen den Komplexen I, II und III der Atmungskette [52]. COQ10 kommt in allen Membranen des menschlichen Organismus vor und spielt neben seiner essentiellen Aufgabe bei der ATP Produktion auch eine wichtige Rolle als Antioxidans und ist somit wesentlich in der Limitierung der Produktion von ROS beteiligt [53]. In diesem Zusammenhang ist auch eine Reduktion der COQ10-Konzentration in Zellen mit einer Vielzahl von Störungen, wie beispielsweise neurodegenerativen, muskulären oder kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert [54].

## 2.5. Morphologische Veränderungen der Skelettmuskulatur und der Mitochondrien im Hinblick auf das FMS

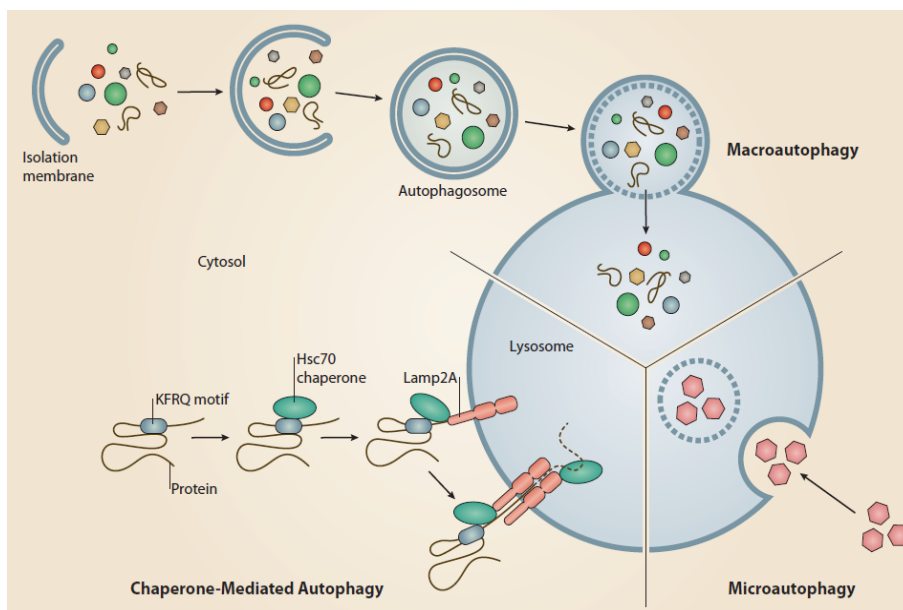
Mitochondriale Defekte beziehungsweise Veränderungen dieser Organellen, werden in der Pathogenese und der Symptomatik des FMS als einflussreich angesehen. In diesem Zusammenhang können auch morphologische Veränderungen der Muskelzellen selbst stehen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass aufgrund des mitochondrialen Schadens ein geringeres Angebot an ATP für die Zelle bereitsteht. Dies wirkt sich negativ auf Funktion und Zustand der Muskelzelle aus. Solche morphologischen Veränderungen konnten bereits an Muskelbiopsien einer kleinen Gruppe von Patienten mit FMS gezeigt werden und äußerten sich in verzerrten Aktin- und Myosinfilamenten. Das Muskelgewebe schien mottenfraß-ähnlich zersetzt zu sein und zusätzlich konnten Glykogen und Lipid-Akkumulationen gefunden werden [55, 56]. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mitochondrien zeigten deutliche Unterschiede in Anzahl und Konstitution dieser Organellen. Dabei wiesen Patienten, die an einem FMS litten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe eine deutlich

geringere Anzahl an Mitochondrien auf. Darüber hinaus waren die Mitochondrien der erkrankten Patienten im Durchmesser größer und zeigten weitere morphologische Auffälligkeiten in Form, Gestalt und Distribution, die auf Schäden eben dieser Organellen schließen ließ [55].

Cordero *et al.* haben zusätzlich zu den morphologischen Veränderungen der Mitochondrien auch molekulare Aberrationen feststellen können. Diese äußerten sich hauptsächlich in einer Verminderung des COQ10-Proteingehaltes [57] sowie des mitochondrialen Membranpotentials in mononukleären Blutzellen, Speicheldrüsen und Hautbiopsien von Patienten mit FMS [58-60]. Beide Effekte führen zu einer verminderten Aktivität der ATP-Synthase, die zum einen für die Energiegewinnung zum anderen für die „Entgiftung“ von Sauerstoffradikalen zuständig ist [58, 59, 61, 62]. Über diese Fehlfunktion der ATP-Synthase und der damit reduziert zur Verfügung stehenden Energie könnten auch zahlreiche Symptome des FMS, wie beispielsweise die starken Muskelschmerzen oder die schnelle Ermüdung der Muskulatur, erklärt werden. Zudem wiesen Patienten mit FMS erhöhten oxidativen Zellstress auf [63], welcher durch ein Ungleichgewicht zwischen freien Radikalen und antioxidativ wirksamen Enzymen entsteht. Eine verminderte antioxidative Kapazität konnte sowohl im Serum als auch in der Muskulatur von Patienten mit FMS nachgewiesen werden und korrelierte ebenfalls mit der klinischen Symptomatik [64-66]. Ebenso konnte eine Korrelation der klinischen Symptome mit dem Ausmaß der Lipidperoxidation, einer Folge von oxidativem Stress und Mitochondriendysfunktion, nachgewiesen werden [67]. Die Verabreichung von antioxidativ wirksamem Vitamin C und E führte in einer klinischen Pilotstudie zu einer Verbesserung der Symptomatik und bestätigt daher die Hypothese der mitochondrialen Dysfunktion in der Muskulatur [65, 68] und befürwortet damit weitere eingehende Analysen und Untersuchungen auf diesem Gebiet.

## 2.6. Autophagie und ihr Stellenwert für den Zellstoffwechsel

Die Autophagozytose oder Autophagie ist ein essentieller Abbauprozess, der für Qualitätskontrollabläufe der Zelle von großer Bedeutung ist, da sie zum einen an der Degradation von beschädigten zellulären Komponenten eine Rolle spielt und zum anderen auch bei Erschöpfung von zellulären Ressourcen den Verbrauch von Energiequellen steuert und damit in der Zellhomöostase eine wesentliche Rolle spielt [69, 70]. Gleichzeitig kann Autophagie auch als Überlebensmechanismus der Zelle dienen. Der Begriff Autophagie stammt aus dem Griechischen und bedeutet so viel wie „Selbstverdauung“ [71, 72]. Es lassen sich drei unterschiedliche Typen von Autophagie unterscheiden, darunter die Chaperon-vermittelte Autophagie, die Mikroautophagie und die Makroautophagie (*Abbildung 4*).



**Abbildung 4: Die verschiedenen Arten von Autophagie.**

Dargestellt sind die drei Haupttypen von Autophagie in Säugerzellen nach [73].

Obwohl sich die einzelnen Formen der Autophagie bezüglich des Mechanismus unterscheiden, wie die für den Abbau vorgesehenen Substrate zum Lysosomen transportiert und in jenes aufgenommen werden, sind sie hinsichtlich der finalen und fundamentalen Schritte der Proteindegradation identisch. Sowohl Mikro- als auch Makroautophagie können in Abhängigkeit der abzubauenen Substrate entweder selektiv oder nicht-selektiv ablaufen (*Tabelle 1*).

Name		Cargo	Characteristics	
Macroautophagy				
	Nonselective	Random cytoplasm	Autophagosome formation	
		Cvt pathway	Autophagosome or Cvt vesicle formation; Atg19 and Atg34 are receptors, Atg11 is a scaffold	
	Selective	Mitophagy	Damaged or superfluous mitochondria	Autophagosome formation; Atg32 is a receptor, Atg11 is a scaffold
		Pexophagy	Superfluous peroxisomes	Autophagosome formation; Atg30 and Atg36 are receptors, Atg11 and Atg17 are scaffolds
Microautophagy				
	Nonselective	Random cytoplasm, vacuole membrane	Vacuole invagination	
		Mitochondria	Vacuole invagination or protrusion	
	Selective	Peroxisomes	Vacuole invagination or protrusion	
		Nuclear membrane	Vacuole invagination, requires Nvj1 and Vac8	

**Tabelle 1: Unterschiede zwischen Makro- und Mikroautophagie.**

Die Tabelle zeigt die Abstufung zwischen selektiver und non-selektiver Makro- und Mikroautophagie, der verschiedenen Substrate und typischen Charakteristiken im Ablauf [74].

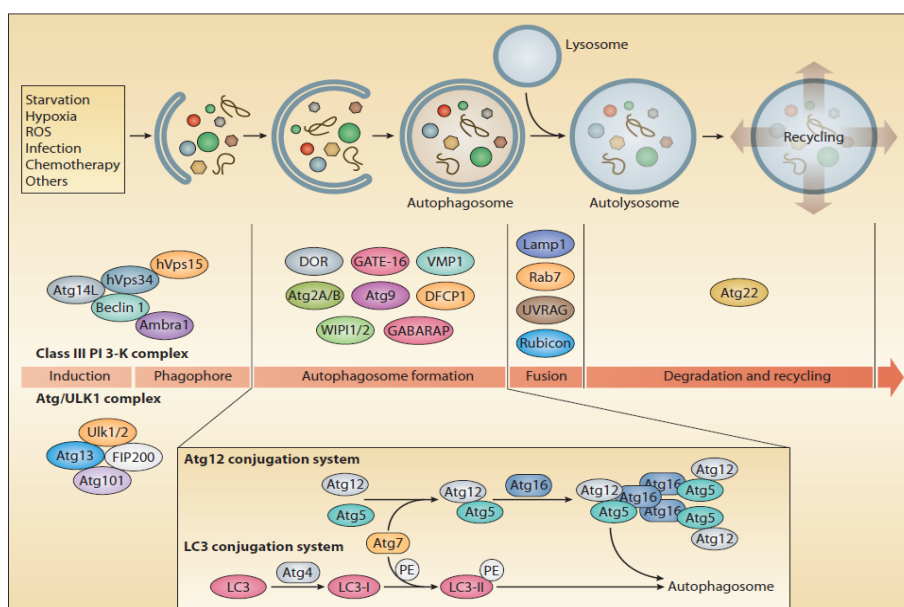
Im weiteren Verlauf soll nur noch auf die Makroautophagie eingegangen werden, da sie die für diese Arbeit relevante Form der Autophagie darstellt. Der Prozess der Makroautophagie wird als ein überwiegend nicht-selektiver Prozess angesehen, wobei der Abbau von Zellorganellen wie Mitochondrien, Ribosomen und Peroxisomen, aber auch die Degradation intrazellulären Pathogene als selektiver Prozess abgezeichnet wird (*Tabelle 1*) [75]. Bei der Makroautophagie wird das zu beseitigende Material umgrenzt von einem doppelmembranösen Vesikel, dem sogenannten Autophagosom, zum Lysosom befördert und verschmilzt mit diesem zum sogenannten Autolysosom, in welchem ferner die weitere katabolische Degradation stattfindet [76].

Die Makroautophagie, die im Folgenden als Autophagie bezeichnet wird, tritt in jedem Gewebe- und Zelltyp auf und wird dazu benötigt, die Zellhomöostase aufrecht zu erhalten [77, 78]. Demgegenüber steht die induzierte Autophagie, die im Gegensatz dazu als eine Art „Stressantwort“ der Zelle durch jegliche Art von metabolischer Überbeanspruchung oder aber durch einen Mangel an Nährstoffen ausgelöst werden kann. Somit stellt die induzierte Autophagie in erster Linie ein Überlebensmechanismus der Zelle dar, der intrazelluläre Komponenten wiederverwertet, um erneut das Energieäquivalent ATP zu generieren [75]. Autophagie stellt damit als induzierte Form neben der Apoptose und der Nekrose eine der drei Hauptarten des Zelltodes dar. Interessanterweise scheinen autophagische Prozesse



auch auf unterschiedlichste Weise mit Apoptose verknüpft zu sein [79].

Der Autophagie liegt ein molekularer Schaltkreis zugrunde, der der Regulation mehrerer Signalkaskaden unterliegt, wobei vor allem die Familie der Autophagie-regulierenden Proteine (Atg) in diesen Prozessen eine wesentliche Rolle einnimmt [71, 76]. Autophagie beginnt mit der Bildung der Isolationsmembran und damit dem sogenannten Phagopore an einer sogenannten preautophagosomalen Struktur (PAS). Der Ursprung dieser Struktur in Säugetierzellen wird weiterhin kontrovers diskutiert, dennoch gibt es Hinweise auf eine Ableitung von der Doppellipidschicht des Endoplasmatischen Reticulums und des Golgi-Apparates [80]. Je nach Ausgangspunkt können zwei verschiedenen Komplexe am PAS zusammenkommen, um letztendlich den Anlaufpunkt für die Autophagie zu bieten. Dabei spielen MAP1LC3B und BECN 1 eine wesentliche Rolle.



**Abbildung 5: Der molekulare Mechanismus der Makroautophagie.**

Die Abbildung zeigt Auslösefaktoren und die unterschiedlichen Schritte der Makroautophagie nach [73].

Über diese beiden Konjugations-Systeme und die Rekrutierung weiterer wichtiger Proteinkinasen und Atg-Proteinen erfolgt die Elongation der Isolationsmembran die sich im Verlauf in das doppelmembranöse Autophagosom verwandelt, welches den „Zellabfall“ komplett beinhaltet (Abbildung 5) [71, 81]. MAP1LC3B wird im Großteil aller Zellen als zytosolisches Protein exprimiert, welches nach der Induktion von Autophagie, zunächst durch weitere Atg-Proteine proteolytisch zu MAP1LC3B-I gespalten wird. Das aktivierte MAP1LC3B-I wird dann über das erneute Mitwirken von Atg-Proteinen und letztendlich der Konjugation mit Phosphatidylethanolamin zu MAP1LC3B-II weiterverarbeitet. Dieses wiederum wird rekrutiert und sowohl auf der inneren als auch der äußeren Membranseite des Autophagosoms exprimiert und spielt dabei eine Rolle bei der Fusion von Membranen



sowie bei der Selektion des zu degradierenden Materials. Somit sind die Synthese und die Verarbeitung von MAP1LC3B während des Ablaufs autophagischer Prozesse gesteigert. Außerdem werden Atg-Proteine mit Ausnahme einer Fraktion an MAP1LC3B-II, aus der Membran des Autophagosoms erneuert. MAP1LC3B-II stattdessen, wird zusätzlich in das lysosomale Kompartiment transportiert. Aus diesen Gründen kann die Analyse des LC3 Protein-Gehaltes Rückschlüsse auf den Ablauf und die Quantität von Autophagie in einer Zelle liefern [82, 83]. Der eigentliche Entsorgungsprozess findet statt, nachdem das aus dem Phagopor fertig gereifte Autophagosom mit dem Lysosom, als spezialisiertes endosomales Kompartiment der Zelle fusioniert und damit das Autolysosom bildet. Innerhalb des Lysosoms wird der Inhalt durch lysosomale Säureproteasen, wie unter anderem Cathepsin D, B und L zersetzt und abgebaut [84]. Im Anschluss werden die durch den Abbau des Materials gewonnenen Aminosäuren und andere nützliche Stoffe über lysosomale Permeasen und Transporter wieder in das Zytosol befördert, wo sie erneut wiederverwertet werden können [81].

Eines der dabei relevanten multifunktionalen Adaptormoleküle ist das sogenannte Sequestosome1/p62 (p62). Dieses ist ein Protein mit multiplen Domänen, welches über seine Fähigkeit der Interaktion mit verschiedenen Schlüsselkomponenten unterschiedlicher Signalmechanismen als funktioneller Knotenpunkt gilt [85]. p62 verfügt über mehrere Domänen, unter anderem einer LC3- Interaktionsregion [86]. Darüber erfüllt es die essentielle Aufgabe der Beförderung von Molekülen zum Lysosom, um letztendlich eine Degradation zu ermöglichen [87, 88].

Die autophagische Degradation von Mitochondrien wird als sogenannte Mitophagie bezeichnet. Sie ist eine Form der selektiven Autophagie und tritt sowohl als Makro- als auch als Mikroautophagie auf. Die dynamische Natur der Mitochondrien ist essentiell für die mitochondriale Qualitätskontrolle und somit werden diejenigen Organellen, die aufgrund eines Schadens oder einer Dysfunktion an den dynamischen Prozessen nicht mehr teilnehmen, durch Mitophagie aus der Zelle entfernt. Mitophagie tritt in Säugetierzellen überwiegend bei einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials auf [89]. Damit bewirkt Mitophagie eine Limitierung der Produktion von ROS [90]. Mitochondrien werden unter einer Vielzahl an Zuständen über selektive Autophagie eliminiert. Zu diesen Prozessen zählen unter anderem die basale mitochondriale Qualitätskontrolle, mitochondriale Dysfunktion und verschiedene Entwicklungsprozesse, wie zum Beispiel während der Reifung roter Blutzellen.

In der Literatur gibt es nur wenige Arbeiten, die den Zusammenhang des FMS zu autophagischen Prozessen beziehungsweise zur Mitophagie in Zellen beschreiben. Es wurde bereits festgestellt, dass COQ10-defiziente Fibroblasten sowohl erhöhte Konzentrationen an lysosomalen Markern (zum Beispiel Cathepsin, Map1lc3b-II) als auch

eine verstärkte Expression von autophagischen Genen auf transkriptioneller sowie translationaler Ebene aufweisen [91]. Zudem konnte durch Cordero und Mitarbeiter festgestellt werden, dass in mononukleären Blutzellen Fibromyalgie-erkrankter Patienten MAP1LC3B-II und BECN1 als essentielle Autophagie-Marker hochreguliert waren [58]. In derselben Arbeit wiesen elektronenmikroskopische Analysen dieser Blutzellen eine autophagische Degradation von Mitochondrien auf. Aufgrund dieser Erkenntnisse, erschließt sich die potentiell wichtige Bedeutung der Auto- und Mitophagie für das Erkrankungsbild der FMS.

## 2.7. Tiermodelle für das FMS

In den letzten Jahren konnten verschiedene Tiermodelle des FMS entwickelt werden [16]. Neben der pharmakologischen Beeinflussung zentralnervöser Mediatoren (z.B. Serotonin, Noradrenalin) oder intramuskulären Säureinjektion wurden insbesondere Modelle der Stress-induzierten Hyperalgesie als adäquate Modelle zur Auslösung Fibromyalgie-ähnlicher Symptomatik etabliert und beschrieben. Dabei stellt das sogenannte SART (*specific alternation of rhythm in temperature*) -Modell den Ursprung der Modelle dar, die durch alternierenden Kältestress eine Hyperalgesie bei Versuchstieren auslösen. Das SART-Modell verfolgt das Prinzip Mäuse tagsüber alternierenden Temperaturen, nachts hingegen ausschließlich Kältegraden auszusetzen. Die Kälteperioden tagsüber werden über einen Zeitraum von mindestens einer Stunde gewählt. Mehrere Modifikationen dieses Modells, unter anderem das konstante Kältestressmodells (CCS-Modell), unter welchem die Versuchstiere drei Tage lang konstanten Temperaturen von 4°C ausgesetzt waren, führten letztendlich zu einem verbesserten Verfahren. Dieses besagte Modell ist das intermittierende Kälte-Stress-Modell der Maus, das vor allem in den letzten Jahren besonders an Bedeutung gewonnen hat [12]. Das Prinzip des ICS-Modells beruht darauf, die Mäuse tagsüber für etwa sechseinhalb Stunden einem intermittierenden Kältestress auszusetzen, indem die Umgebungstemperatur der Mäuse alle 30 Minuten zwischen Raumtemperatur (24 °C) und Kältegraden (4 °C) alterniert. Über Nacht werden die Mäuse ebenfalls den Kältegraden ausgesetzt. Diese Prozedur wird für zwei Tage wiederholt, bevor am dritten Tag dann die Untersuchung der Mäuse auf Stressparadigmen erfolgte. Diese Nozizeptions-Tests wurden entweder über einen mechanischen oder einen thermischen Stimulus an der Pfote des Versuchstieres induziert. Das ICS-Modell erzielt als einziges Modell eine der Fibromyalgie entsprechende, lange anhaltende Hyperalgesie und Allodynie in C57BL/6J-Mäusen. Weiterhin ist besonders, dass in Analogie zur klinischen Situation beim Menschen in diesem Modell die Schmerzsymptomatik sowohl durch die Gabe von Antidepressiva als auch durch Gabapentin reversibel ist, durch die Gabe von Morphin jedoch unbeeinflussbar bleibt.

Dieses Phänomen weist auf eine ähnliche Pathophysiologie hin, der zum Beispiel über eine Aktivierung deszendierender serotoninerger Neurone erfolgen könnte [92]. Somit weist das ICS-Schema einen klaren Vorteil gegenüber den oben genannten anderen Modellen auf.

## 2.8. Fragestellung

In der Literatur wurden Auswirkungen und Symptome des intermittierenden Kältestresses schon eingehend bezüglich der Schmerzsymptomatik und dem Ansprechen auf Analgetika bzw. Antidepressiva beschrieben. Bislang wurde allerdings noch nicht erforscht, ob intermittierender Kältestress auch Auswirkungen hinsichtlich morphologischer oder biochemisch-molekularer Eigenschaften in der Skelettmuskulatur bedingt [10-12]. Auf der Basis der bereits vorhandenen Forschungsarbeiten und Erkenntnisse, besonders in Bezug auf Untersuchungen an Muskelbiopsien und Blutproben von Patienten mit FMS, ist es Ziel dieser Arbeit, die Effekte des intermittierenden Kältestresses auf den Stoffwechsel, die mitochondriale Funktion und das Muskelgewebe von C57BL/6J Mäusen zu beurteilen.

Als erste wichtige Fragestellung galt es die Ergebnisse der histologischen Analysen zu validieren. Dabei diente die Bestimmung der Sarkomerlängen der Beurteilung morphologischer Veränderungen. Die Untersuchungen bezüglich Glykogengehalt in Muskel- und Lebergewebe und der Aktivität der LDH sollten Alternationen auf metabolischer Ebene nachweisen. Eine weitere Zielstellung war es die Expression der mitochondrialen Marker COQ10B und COX4I1 nach Kältestress-Exposition zu evaluieren. Dabei galt es die Expression dieser beiden Moleküle auf Transkriptionsebene zu quantifizieren und mit der Expression auf Proteinebene zu korrelieren.

Als Nächstes wurden elektronenmikroskopisch Gewebe- und Strukturveränderungen in Muskelpräparaten der Mäuse untersucht und dabei ein besonderes Augenmerk auf autophagische Muster gelegt.

Zuletzt wurde die Expression der Autophagie-spezifischen Marker *Map1lc3b* und *Becn1* auf Transkriptionsebene untersucht. Die Expression von MAP1LC3B und p62 wurde zusätzlich auf Translationsebene analysiert. Ebenso erfolgte eine immunhistochemische Untersuchung der MAP1LC3B-Proteinverteilung im Muskelgewebe der Mäuse.

Die Ergebnisse dieser Arbeit ermöglichen ein besseres Verständnis der Pathogenese des FMS. Ebenso können sie als Angriffspunkt vielversprechender Therapiemöglichkeiten, wie beispielsweise der Supplementierung von Antioxidantien, Vitaminen oder mitochondrialer Moleküle dienen und damit zu einer erheblichen Verbesserung und Bereicherung der Behandlung dieses Syndroms führen.

### 3. Materialien und Methoden

#### 3.1. Materialien

##### 3.1.1. Geräte

Gerät	Typ	Firma
Blottingkammer	<i>SD20 Semi Dry Blotter</i>	Mason Technology, Dublin (Irland)
Chemilumineszenzdetektor	FUSIONS <sup>SL</sup> -4	VilberLourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell (Deutschland)
	<i>SNAPi.d. Protein Detection System</i>	Millipore, Billerica, MA (USA)
Elektrophoresekammer	<i>EasyPhor PAGE Mini</i>	LonzaRockland Inc., Rockland, ME (USA)
ELISA-Reader	<i>Emax precision microplate reader S/N E 10643</i>	Molecular Devices GmbH, München (Deutschland)
Inkubator		Heraeus, Instruments, Osterode (Deutschland)
Mikroskop	Olympus	Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo (Japan)
Vakuumpumpe	Millivac	Millipore, Billerica, MA (USA)
Software	<i>Bio-Rad CFX-Manager 2.0</i>	Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA (USA)
Detektionsgerät	<i>Fusion-CAPT 15.15</i>	VilberLourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell (Deutschland)
Densitometrie-Software	<i>Bio-1D Version 15.01</i>	VilberLourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell (Deutschland)
	<i>SOFTmax Pro 3.1.1</i>	Molecular Devices Inc., San Diego, CA (USA)
	<i>Leica QWin Pro V3</i>	Leica Camera AG, Solms (Deutschland)

	<i>GraphPadPrism 5</i>	GraphPadPrism Software ( Inc., Ca, USA)
	EXCEL 2010	Microsoft Corporation (Redmond, WA 98052-6399 USA)
	<i>ImageJ version 1.48p</i>	National Institutes of Health (Maryland, USA)
Sonstiges	Wasserbad TW 20	JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach (Deutschland)
	Blutgasanalyse-Gerät AnalysatorABL800Flex	Radiometer GmbH, Willich (Deutschland)
	Mikrowelle MW771	CLATRONIC® International GmbH, Kempen (Deutschland)
	HeizblockBioER CHB-202	Biozym Scientific GmbH, Hess.Oldendorf (Deutschland)
	Magnetrührer MR Hei- Standard	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach (Deutschland)
	AutoclavSystec VX-95	Systec GmbH, Wittenberg (Deutschland)
	Rotationsmikrotom Leica® RM 2125 RT	LeicaCamera AG, Solms (Deutschland)
	Barnstead ElectrothermalWaxdispender	BarnsteadElectrothermal, UK
	KühlplatteMeditate COP 30	MEDITE Medizintechnik GmbH, Burgdorf (Deutschland)
	Eismaschine	Manitowoc GmbH, Herborn (Deutschland)
	Pipetten Discovery Comfort (2;10;20;100;200;1000µl)	Abimed Hit Lab Solutions, Warschau (Polen)
	Pipetboyaccu-jet®	Brand GmbH+ CO KG, Wertheim (Deutschland)

	Sterilbank KR 125	Kojair Tech Oy, Vilppula (Finnland)
	Abzug AC3 1-250590106 AZ1	WALDNER Laboreinrichtungen GmbH & CO. KG, Wangen (Deutschland)
	Abzug AC3 110-AZ1	WALDNER Laboreinrichtungen GmbH &CO. KG, Wangen (Deutschland)
	<i>VORTEXGENIE2</i>	Scientific Industries INC, NY (USA)
	<i>Flex Cycler</i>	Analytic Jena AG, jena (Deutschland)
	<i>CFX 96 RT PCR Detection System</i>	Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA (USA)
	Waage Kern ABS 80-4	Kern & Sohn GmbH, Balingen (Deutschland)
	Waage Kern PLS 4200-2F	Kern & Sohn GmbH, Balingen (Deutschland)
	Kühlschrank LIEBHERR Comfort	Liebherr-International AG, Biberach an der Riss, (Deutschland)
	Kühl-Gefrier (-20°C)-Combi KGS 3213-5	Liebherr-International AG, Biberach an der Riss
	Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr-International AG, Biberach an der Riss, (Deutschland)
	Gefrierschrank (-80 °C) Ultra-Low <i>Temperaturefreezer</i>	SANYO Electric Co., Ltd., Moriguchi, Präfektur Ōsaka (Japan)
	Bio Photometer plus	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
	<i>MP FastPrep®-24 Sample Preparation System</i>	M.P. Biomedicals Irvine, California (USA)

Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5430R	Eppendorf, Hamburg(Deutschland)
	Combi-spin FVL- 2400 IV	Biosan Ltd., Riga (Lettland)
	Mikroliter	Hettich, Tuttlingen (Deutschland)

### 3.2. Primer, Antikörper, Kits, Chemikalien, Reagenzien, Medien, Puffer, Lösungen und Verbrauchsmaterialien

#### Primer

Primer mRNAs	Produktname	Firma
BECN1	MmBecn1_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN GmbH, Hilden (Deutschland)
COQ10B	MmCoq10b_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN GmbH, Hilden (Deutschland)
COX4I1	Mm_Cox4i1_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN GmbH, Hilden (Deutschland)
GAPDH	Mm_Gapdh_3_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN GmbH, Hilden (Deutschland)
MAP1LC3B	Mm_Map1lc3b_2_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN GmbH, Hilden (Deutschland)

#### Antikörper

##### Primärantikörper

Antigen	Bestellnummer	Spezies	Verdünnung	Firma
Cox IV	ab 16056	Kaninchen	1: 666,67	Abcam plc, Cambridge (UK)
GAPDH	ab 9485	Kaninchen	1: 1000	Abcam plc, Cambridge (UK)
LC3b	ab 51520	Kaninchen	1: 1000	Abcam plc, Cambridge (UK)
Coq10b	ab 41997	Kaninchen	1: 187,50	Abcam plc, Cambridge (UK)

SQSTM1/p62	ab 96706	Kaninchen	1: 303,03	Abcam plc, Cambridge (UK)
------------	----------	-----------	-----------	------------------------------

### Sekundärantikörper

Antigen	Verdünnung	Firma
Kaninchen	1:3000	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (Deutschland)

### Kits

Kit/Name	Inhalt	Firma
<i>iScript™ cDNA Synthesis Kit</i>	<i>iScript reaction mix</i> <i>iScript reverse transcriptase</i> <i>Nuklease freies H<sub>2</sub>O</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
<i>Lactate Dehydrogenase Activity Assay</i>	<i>LDH Assay Buffer</i> <i>LDH Substrate Mix</i> <i>NADH Standard</i> <i>LDH Positive Control</i>	BioVision Research Products, Mountain View, CA (USA)
<i>Pierce® BCA Protein Assay Kit</i>	<i>BCA Reagent A</i> <i>BCA Reagent B</i> <i>Albumin Standard Ampule</i>	Thermo Scientific Inc., Waltham, Ma (USA)
<i>RNeasy Mini Kit</i>	<i>RNeasy Mini spin Columns</i> <i>Collection tubes</i> <i>RW1-Buffer</i> <i>RPE-Buffer</i> <i>RNase freies H<sub>2</sub>O</i>	QIAGEN GmbH, Hilden (Deutschland)
<i>SsoFast™ EvaGreen® Supermix</i>	<i>SsoFast™ EvaGreen® Supermix</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
<i>Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate</i>	<i>Luminol/Enhancer</i> <i>Stable Peroxide Buffer</i>	Thermo Scientific Inc., Waltham, Ma (USA)
<i>VECTASTAIN®ABC KIT Elite PK-6101 Rabbit IgG</i>	<i>Goat normal Serum</i> <i>Anti Rabbit IgG Biotinylated Antibody</i> <i>Reagent A</i> <i>Reagent B</i>	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA (USA)



*Chemikalien und Reagenzien*

<b>Typ</b>	<b>Firma</b>
BSA, Serum Albumin Fraktion 5, Biotin frei	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe (Deutschland)
Citronensäure-Monohydrat, 4N NaOH	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe (Deutschland)
EDTA	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe (Deutschland)
HCl, 4M	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe (Deutschland)
Hepes Pufferan® >99,5%	Sigma-Aldrich Chemie-GmbH, Steinheim (Deutschland)
PBS	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)
<i>QIAzol Lysis Reagent</i>	QIAGEN GmbH, Hilden (Deutschland)
Sucrose	Sigma-Aldrich Chemie-GmbH, Steinheim (Deutschland)
Trypsin-Pulver	Sigma-Aldrich Chemie-GmbH, Steinheim (Deutschland)
Trypsin-Inhibitor, (aus Sojabohne)	Sigma-Aldrich Chemie-GmbH, Steinheim (Deutschland)

Alle nicht weiter aufgeführten aber benutzten Chemikalien und Reagenzien sind von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie-GmbH, Steinheim (Deutschland) und Carl Roth GmbH+ Co. KG, Karlsruhe (Deutschland) und stammen aus dem Bestand des Instituts für Chirurgische Forschung Marburg.

### Puffer und Lösungen

Typ	Zusammensetzung
Waschpuffer	0,3 M Sucrose 10 mM HEPES (pH 7,2) 0,2 mM EDTA
Isolationspuffer	0,3 M Sucrose 10 mM HEPES (pH7,2) 0,2 mM EDTA 1mg/ml BSA
Trypsin-Lösung	2,5 mg/ml Trypsin 1 mM HCl
Trypsin-Inhibitionslösung	0,65 mg/ml Isolationspuffer
Jie's Puffer	100 mM NaCl 20% (V/V) NP-40 20 mM Tris-HCl (pH 7,4) 5 mM MgCl <sub>2</sub> 100 mM PMSF nach Herstellerangaben Proteaseinhibitor (als <i>Complete</i> -Tabletten) und Phosphataseinhibitor
0,1 % TBS-Tween	150 mM NaCl 7,7 mM Tris-HCl (pH 7,4) 0,1% (V/V) Tween 20 Bis pH 8,0 eingestellt mit HCl (4N)
TE-Puffer pH 8,0	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA

### Verbrauchsmaterialien

Alle Verbrauchsmaterialien wie beispielsweise Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße etc. als auch das chirurgische Besteck für die Gewebepräparation, stammten aus dem Bestand des Instituts für Chirurgische Forschung Marburg. Die Materialien wurden von folgenden Firmen gekauft: Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (Deutschland), Biozym Scientific GmbH, Oldendorf (Deutschland), Eppendorf, Hamburg (Deutschland), Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland), Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (Deutschland), PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen (Deutschland), Aesculap AG, Tuttlingen (Deutschland), Kobe KG, Marburg (Deutschland).

### 3.3. Herkunft und Haltungsbedingungen der Versuchstiere

Zur Untersuchung des Einflusses des intermittierenden Kältestresses auf die Versuchstiere wurden insgesamt 36 C57BL/6J Mäuse eingesetzt, 18 davon männlich und die weiteren 18 Mäuse weiblich. Alle Versuchstiere entstammten dem genetischen Hintergrund des C57BL/6J Mausstammes und wurden von Charles River (Paris, Frankreich) bezogen.

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen im Biomedizinischen Forschungszentrum der Philipps Universität Marburg. Das Lichtregime für die Kontrolltiere wurde permanent, für die durch Kältestress zu behandelnden Tiere vor dem Beginn des Versuches über Zeitschaltuhren (definierter Tag/Nacht-Rhythmus) gesteuert. Haltung und Zucht erfolgten in klimatisierten Räumen (22-24°C Raumtemperatur) und pelletiertes Zuchtfutter stand allen Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Tierhaltung und Versuchsprotokolle wurden durch die Regierung Hessen (V 54 - 19 c 20 15 (1) MR 20/19 Nr. 8/2012) und die zuständige Stelle der Universität Marburg geprüft sowie genehmigt und entsprechen den internationalen Richtlinien für Tierversuche.

### 3.4. Methoden

#### 3.4.1. Versuchstiergruppen und Behandlungsschema (ICS-Modell)

Insgesamt wurden Gewebeproben von 35 Tieren ausgewertet, davon waren 18 männlich und 17 weibliche Tiere (ein Tier starb während des Versuchsvorhabens). Aus diesen beiden Gruppen wurden jeweils 9 männliche und 9 weibliche Tiere dem intermittierenden Kältestress ausgesetzt, die weiteren 9 männlichen Tiere und 8 weiblichen Tiere dienten als Kontrolltiere und erhielten keine Behandlung (*Abbildung 6*).

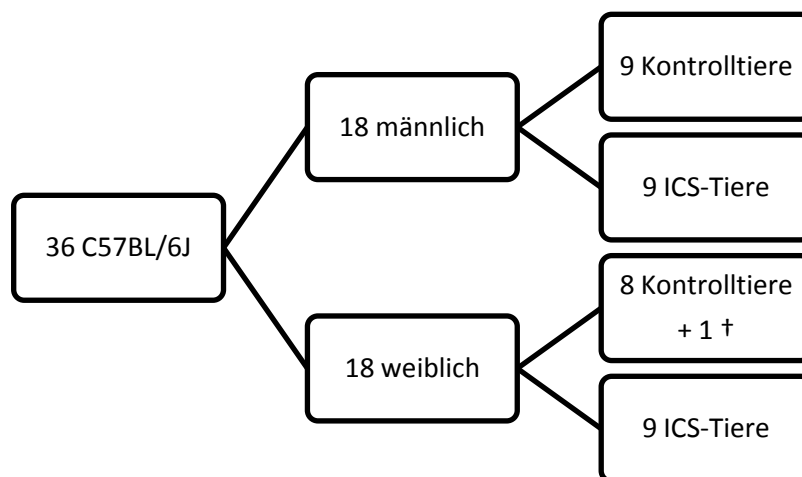


Abbildung 6: Versuchstiergruppen

Die 18 für das Behandlungsschema vorgesehenen Tiere wurden gemäß dem Mausmodell von Nishiyori *et al.* 3 Tage lang intermittierendem Kältestress ausgesetzt, der bei den Mäusen eine fibromyalgie-ähnliche Schmerzsymptomatik auslöst. Die Tiere wurden dabei am 1. Tag über Nacht (von 16:30 Uhr bis 10:00 Uhr) einer Temperatur von 4°C ausgesetzt. Am Folgetag wurden die Mäuse von 10 Uhr bis 16:30 Uhr alle 30 min im Wechsel alternierenden Temperaturen zwischen 24°C und 4°C ausgesetzt. Diese Prozedur wurde insgesamt zweimal wiederholt. Am dritten Tag erfolgte vor der Tötung eine Adaptation an 24°C Raumtemperatur für mindestens 1 Stunde.

Die Tiere wurden jeweils einzeln in den Käfigen gehalten und erhielten weiterhin, wie auch die Kontrolltiere pelletiertes Futter und Wasser *ad libitum*. Das Licht im Kühlraum wurde tagsüber angelassen und ab 16:30 Uhr ausgeschaltet.

### **3.4.2. Tötung der Versuchstiere und Gewinnung der Proben**

Vor der Tötung, wurde jedes einzelne Tier gewogen, um das jeweilige Gewicht zu eruieren und um Gewichtsunterschiede und –Veränderungen zu erfassen.

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Dies entspricht den Richtlinien der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS). Eine Tötung durch CO<sub>2</sub> kam für das ICS-Tiermodell nicht in Frage, da durch diese Art der Tötung, bei den Tieren üblicherweise eine Erstickungsangst entsteht, die hinsichtlich der Bewertung der durch den induzierten Stress der wechselnden Kalt-/Warm-Zyklen bedingten erhöhten Schmerzsymptomatik zu Verfälschungen des Ergebnisses führen könnte.

#### **3.4.2.1. Blutentnahme**

Die Blutentnahme erfolgte vor der zervikalen Dislokation aus dem retroorbitalen Venenplexus. Das Blut wurde zunächst mittels einer Glaskapillare aus dem retroorbitalen Venenplexus entnommen und anschließend in einem mit 0,1 ml Heparin-Natrium beschichtetem Reaktionsgefäß überführt, um die frühzeitige Gerinnung des Blutes zu vermeiden. Schließlich wurde das Blut in eine Blutgasanalyse-Spritze (BGA-Spritze) aufgezogen und in einem BGA-Gerät analysiert.

#### **3.4.2.2. Gewebepräparation**

Mit einer chirurgischen Schere und einer chirurgischen Pinzette wurde im Folgenden die Bauchdecke in der Medianlinie bis auf Höhe des Sternums eröffnet. Nach Anlegen von Entlastungsschnitten entlang der Rippenbögen konnte die Leber im Oberbauch freigelegt werden. Nach Entfernung von Bändern sowie Gefäßen, wurde die Leber mit ihren einzelnen Lappen entnommen.

Für Histologische Schnitte wurde jeweils ein linker Leberlappen für mindestens 48-72 h in 4%iger Formalin-Lösung fixiert. Die rechten Leberlappen wurden für ausstehende Untersuchungen in Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C gelagert.

Anschließend erfolgte die Präparation der Muskulatur. Zunächst wurde durch einen Hautschnitt ausgehend von der Leistenregion bis hin zum distalen Unterschenkel, die Beinmuskulatur komplett freigelegt. Zu Beginn wurde der für die Mitochondrienisolation vorgesehene linke *M. quadriceps femoris* frei präpariert und bis zur direkten Weiterverarbeitung im Anschluss an die Präparation, in mit Waschpuffer gefüllte und auf Eis stehende 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt.

Für Western Blot Analysen aus Gesamtzellextrakt wurde der linke *M. biceps femoris* isoliert und bis zur Verarbeitung bei -80°C gelagert. Als nächstes wurde am Unterschenkel der Maus der linke *M. tibialis anterior* isoliert, der für histologische und immunhistochemische Schnitte ebenfalls für mindestens 48-72 Stunden in 4%iger Formalin-Lösung fixiert wurde.

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurde ebenso am Unterschenkel der rechte *M. gastrocnemius* und der rechte *M. soleus* isoliert. Diese Präparate wurden direkt nach Präparation in 100%iger ITO-Lösung fixiert, um im Anschluss im Institut für Anatomie der Philipps Universität Marburg und der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen nach standardisiertem Protokoll für elektronenmikroskopische Untersuchungen eingebettet zu werden.

Als Letztes wurde für Echt-Zeit quantitative Polymerase Ketten Reaktion (qRT-PCR) ein achillessehnennaher Teil des linken *M. gastrocnemius* abgetrennt und mit einem Tropfen *Tissue Tek*® auf Filterpapier fixiert. Dann wurden die Präparate in durch Stickstoff gekühltes Isopentan getränkt und damit tiefgekühlt. Der Transport zum Anatomischen Institut erfolgte auf Trockeneis und vor Ort wurden die Proben dann bei -80°C eingefroren, bevor sie weiterverarbeitet wurden.

#### 3.4.2.3. Mitochondrienisolation

Die Isolation der Mitochondrien aus dem linken *M. quadriceps femoris* der jeweiligen Maus, erfolgte direkt im Anschluss an die Muskelpräparation und exakt nach dem von Gostimskaya *et al.* beschriebenen Protokoll [93]. Die für die Isolation benötigten Puffer wurden ebenfalls exakt nach Protokoll angesetzt. Es wurde stets auf Eis gearbeitet.

Zunächst wurden die frei präparierten Muskeln für kurze Zeit in mit Waschpuffer gefüllten 1,5 ml Reaktionsgefäßen gelagert. Die Muskeln wurden dann mittels Schere und Micropistill mechanisch zerkleinert und anschließend in ein mit *Waschpuffer* gefülltes 50 ml Reaktionsgefäß gegeben. Diese Muskelsuspension wurde daraufhin durch einen 70 µm feinen Nylon-Filter filtriert und der Überstand verworfen. Die verbliebene zerkleinerte Muskelmasse wurde erneut mit *Waschpuffer* versetzt und zum Aufschluss des Gewebes wurde 2,5 mg/ml Trypsin-Lösung hinzugegeben und mittels Magnetrührer konstant gerührt.

Nach 15 min wurde zum Stoppen der Reaktion 0,65 mg/ml Trypsin-Inhibitor hinzugegeben. Die folgenden Schritte mit mechanischer Zerkleinerung des Gewebes und anschließender Filtration durch einen Nylon-Filter wiederholten sich. Die Proben wurden im Anschluss jeweils viermal Mal zentrifugiert. Der erste Zentrifugationsschritt erfolgte für 15 min bei 600g und 4°C. Das entstandene Pellet wurde verworfen und der Überstand wurde erneut für 15 min bei 8500 g und 4°C zentrifugiert. Danach wurde nun der Überstand verworfen und das die intakten Mitochondrien enthaltende Pellet zunächst mit 1ml Isolationspuffer resuspendiert und anschließend für 15 min bei 8500g und 4°C zentrifugiert. Dieser letzte Schritt wurde einmal wiederholt und die Proben wurden im Anschluss bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

### 3.4.3. Blutgasanalyse

Die Blutgasanalyse wurde mittels Blutgasanalyse-Gerät durchgeführt (Analysator ABL800Flex).

### 3.4.4. Lactatdehydrogenase-Aktivität in mitochondrialen Proben

Die Messung der Lactatdehydrogenase (LDH)-Aktivität erfolgte durch Verifizierung der isolierten Mitochondrien-Proben mittels *Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit*. Es wurde nach Herstellerprotokoll und stets auf Eis gearbeitet, zusätzlich wurde darauf geachtet, dass die lichtempfindlichen Substanzen aus dem *Kit* vor Lichteinwirkung geschützt wurden. Zunächst wurden die Proben, die die intakten Mitochondrien enthielten, auf Eis aufgetaut und abzentrifugiert. Als nächstes wurde der vorhandene Überstand komplett abgenommen, um im Anschluss wieder 100 µl dieses Überstandes auf die Proben zu geben. Dieser Schritt wurde durchgeführt, um die Ausgangsmengen aller Proben gleich zu setzen, da zuvor die Menge des Überstandes von Probe zu Probe variierte. Anschließend wurden 50 µl dieser Proben entnommen und in ein separates Reaktionsgefäß überführt, um sie später für die Extraktion mitochondrialer Proteine zu nutzen. Bis dahin wurden diese Proben wieder bei -80°C gelagert. Die restlichen 50 µl wurden nun für die Messung der Lactatdehydrogenase-Aktivität genutzt. Auf diese 50 µl Mitochondrien-Suspension wurden 500 µl Waschpuffer gegeben und im Vortex gemischt. Von diesem mit Waschpuffer verdünntem Gemisch wurden nun 10 µl entnommen und mit 90 µl *Assay Buffer* gemischt. Zunächst wurden die Proben, der in dem *Kit* enthaltene Standard und die Positivkontrolle auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Als nächstes wurden alle Wells mit *Assay Buffer* auf jeweils 50 µl aufgefüllt und danach wurde in jedes *Well* 50 µl *Reaction Mix* hinzugegeben. Direkt im Anschluss wurde die Absorption der Mitochondrien/Puffergemische in einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Dann wurde die Platte für 30 min bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert und anschließend noch einmal die Absorption der jeweiligen Proben bei einer Wellenlänge von 450nm in dem ELISA-Reader gemessen. Die

Lactatdehydrogenase ist im Generellen eine Oxidoreduktase, die die Reaktion von Laktat zu Pyruvat katalysiert und dabei gleichzeitig die Reduktion von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}$  bedingt. Letztere Reaktion wird in diesem Aktivitäts-Assay ausgenutzt, indem das gebildete  $\text{NADH}$  im weiteren Verlauf mit den verschiedenen Bestandteilen des zugegebenen *Assay Buffers* über eine Farbreaktion reagiert, welche dann kolorimetrisch bestimmt werden kann. Die Berechnung der Lactatdehydrogenase-Aktivität erfolgte exakt nach Anleitung im Herstellerprotokoll.

### **3.4.5. Histologische Untersuchungen**

Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbungen dienten der morphologischen Untersuchung des Muskelgewebes.

Die *Periodic acid-Schiff* (PAS) -Reaktion diente der Beurteilung von Glykogen-Verteilung sowohl in Muskel- als auch in Lebergewebe.

#### **3.4.5.1. Einbettung**

Zunächst wurden die einzelnen Muskel- und Leber-Proben, die bereits zuvor für mindestens 48 h in 4%igem Formalin fixiert wurden etwa 30 min unter fließendes Leitungswasser gestellt. Danach wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50% EtOH, 70% EtOH, 80% EtOH, für jeweils 30 min, 100% EtOH: 3mal jeweils für 20 min) entwässert. Die Proben wurden über Nacht in Zedernholzöl gelagert und am nächsten Tag in einem auf 75°C erhitzten Wärmeschrank im Abstand von mehreren Stunden durch drei Paraffin enthaltende Küvetten geführt, um sie so auf die Einbettung vorzubereiten. Über Nacht blieben die Proben bei 75°C in flüssigem Paraffin. Am folgenden Tag wurden Metallförmchen erhitzt und die Proben wurden einzeln mittels Paraffin-Spender eingebettet.

#### **3.4.5.2. Herstellung von Paraffin-Schnittpräparaten**

Die eingebetteten Muskel- und Leberpräparate wurden am Rotationsmikrotom in 5 µm dünne Schichten geschnitten und in einem Warmwasserbad, welches destilliertes Wasser enthielt von Falten befreit. Nach Überführung auf Objektträger, wurden die Schnittpräparate zum Trocknen und zum Abschmelzen des restlichen Paraffins auf einer Wärmeplatte platziert.

#### **3.4.5.3. Hämatoxylin-Eosin- und PAS-Färbungen**

Die Färbungen der Schnitte erfolgten nach standardisiertem Protokoll und mittels Färbeautomaten am Institut für Pathologie der Philipps-Universität Marburg. Für jeden Muskel wurde je ein Schnittpräparat Hämatoxylin-Eosin und ein weiteres PAS gefärbt. Für jede Leber wurde ein Schnittpräparat PAS gefärbt.

#### 3.4.5.4. Sarkomerlängen

Zur Beurteilung der Sarkomerlängen in den Muskeln, wurden die Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnitte des *M. tibialis anterior* im Lichtmikroskop betrachtet. Das zur Bestimmung der Sarkomerlänge herangezogene Programm war Leica QWin V3 Pro.

Zunächst wurde die Belichtung des Präparates optimiert und ein Weißabgleich durchgeführt. Die Präparate wurden in der höchstmöglichen Vergrößerung von 630x betrachtet. Je Schnittpräparat wurden von 5 verschiedenen Gesichtsfeldern Bilder gemacht und in diesen jeweils 20 verschiedene Sarkomerlängen in  $\mu\text{m}$  gemessen.

#### 3.4.5.5. Glykogengehalt

Zur Bestimmung des Glykogengehaltes wurden PAS- gefärbte Muskel- und Leberpräparate im Lichtmikroskop mit Hilfe des Leica QWin V3 Pro Programmes charakterisiert.

Pro Versuchsgruppe und Gewebespezies wurden 3 verschiedene Schnittpräparate in einer 400-fachen Vergrößerung betrachtet und in diesen mittels der Software *ImageJ* Version 1.48p die RGB-Werte bestimmt, die auf den Glykogenanteil schließen ließen.

### 3.4.6. Proteinextraktion

#### 3.4.6.1. Mitochondriale Extrakte

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  konservierten intakten Mitochondrien-Proben wurden zunächst auf Eis aufgetaut und im Anschluss 5 Minuten lang bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 2000 *rpm* zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden die sich im Pellet befindlichen noch intakten Mitochondrien mittels Zugabe von 70  $\mu\text{l}$  2%iger CHAPS-Lösung und durch anschließendes vortexen (1 min) und zentrifugieren (2 min/  $4^{\circ}\text{C}$ / 14000 *rpm*) aufgeschlossen. Nun enthielt der Überstand die herausgetrennten mitochondrialen Proteine und das die Membranbestandteile enthaltende Pellet konnte verworfen werden. Die Messung der Proteinkonzentration des Überstandes erfolgte unter Verwendung des *Pierce® BCA Protein Assay Kits* photometrisch.

#### 3.4.6.2. Gesamtzellextrakt

Zunächst wurde aus den bei  $-80^{\circ}\text{C}$  konservierten Proben der *Mm. biceps femorii* ein etwa 50 mg schweres Stück entnommen und anschließend daraus Proteine isoliert. Dabei wurde das Gewebe mit 400  $\mu\text{l}$  Jie's Puffer versetzt und mittels MP Fast Prep-Gerätes (35 sec) mechanisch aufgeschlossen. Hiernach wurde die Suspension 30 min auf Eis inkubiert und dabei alle 10 min mittels Vortexer gemischt. Im Anschluss wurden die Proben 30 min lang bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 14000 *rpm* zentrifugiert und der die Proteine enthaltende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Auf diesen Überstand wurden nun 500  $\mu\text{l}$  Jie's Puffer gegeben und das Gemisch wurde erneut zentrifugiert (30 min,  $4^{\circ}\text{C}$ , 14000 *rpm*). Der Protein-



enthaltende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Messung der Proteinkonzentration erfolgte unter Verwendung des *Pierce® BCA Protein Assay Kits* photometrisch.

### 3.4.7. Proteinquantifizierung

Die Messung der Proteinkonzentrationen erfolgte bei allen Proben durch Verwendung des *Pierce® BCA Protein Assay Kits*. Es wurde nach Herstellerprotokoll gearbeitet. Gemessen wurde der Proteingehalt gegen einen angesetzten Albuminstandard. Die Proteinproben selbst wurden 1:10 mit Wasser verdünnt in eine 96-Well-Platte pipettiert. Jede Probe wurde doppelt gemessen. Zu dem Standard und den Proben in der 96-Well-Platte wurden 200 µl einer 50:1 Mischung aus Reagenz A (Pufferlösung) und Reagenz B (Kupfersulfatlösung) gegeben. Die Platte wurde dann für 30 min im Brutschrank inkubiert, um daraufhin an einem ELISA-Reader bei 570 nm Wellenlänge ausgelesen zu werden. Die Auswertung erfolgte am Computer mit Hilfe des Programms *SOFTmax Pro 3.1.1*, welches anhand der Standardreihen den Proteingehalt der einzelnen Proben ermittelte.

### 3.4.8. Western Blot Analysen

#### SDS-PAGE

Für Western Blots unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen wurde stets auf Eis gearbeitet. Es wurden jeweils 20-40 µg Protein auf 13 µl Volumen equilibriert und mit 2 µl *NuPAGE® Sample Reducing Agent* (10x) und 5 µl *NuPAGE® LDS Sample Buffer* (4x) versetzt. Danach wurden die Proben für 10 Minuten auf 70°C erhitzt. Die Elektrophoresekammer wurde zusammengebaut und anschließend wurden 10-20% oder 12% *Tris-Glycine-Agarose* eingespant. Von einem Gemisch aus 475 ml destilliertem Wasser und 25 ml *MOPS SDS Running Buffer* wurden 200 ml in die innere und 300 ml in die äußere Kammer gefüllt. In die innere Kammer wurden noch zusätzlich 500 µl Antioxidans hinzugegeben. Nun wurden die Proben in die Geltaschen gefüllt. Als Längenstandard wurde *Magic Mark™XP Western Protein Standard* verwendet, als elektrophoretische Laufkontrolle *Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standard*. Die Proteine wurden in etwa je nach Lauffront für 120 Minuten bei 100 Volt elektrophoretisch aufgetrennt.

#### Blotting

Der Transfer der in den Gelen aufgetrennten Proteine erfolgte unter halb-trockenen Bedingungen. Für den Transferpuffer wurden 10 ml Methanol, 100 µl Antioxidans, 5 ml Transferpuffer Stock 20x und 84,9 ml destilliertes Wasser gemischt. Filterpapiere und Nitrozellulosemembran wurden in dem Transferpuffer getränkt. In einer *Blot*-Kammer wurde zunächst eine Lage Filterpapier gelegt auf das die Nitrozellulosemembran folgte. Auf die

Membran wurde dann vorsichtig das Gel platziert, welches die aufgetrennten Proteine enthielt. Es wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen Gel und Nitrozellulosemembran befanden. Auf das Gel wurde erneut eine Schicht durchtränktes Filterpapier gelegt. Die Proteine wurden bei 15 Volt (30 min) auf die Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran für zwei Minuten mittels *Ponceau* gefärbt, um das Proteinbanden-Muster beurteilen zu können. Die Membran wurde zum Entfärben der durch die Ponceau-Lösung entstandenen roten Farbe 10 Minuten in TBS mit 0,1% Tween-20 (TBST) gewaschen. Anschließend konnte die Nitrozellulosemembran in TBST eingelegt und für die Immundetektion im Kühlschrank aufbewahrt werden.

#### *Immundetektion*

Zum Färben der Membran mit Antikörpern wurde das Snap i.d. ®System von Millipore verwendet. Dazu wurde die Membran in einen sogenannten *Blot Holder* mit zusätzlichem Filter platziert und anschließend in dem Gerät eingespannt. Die Membran wurde zunächst mit TBST gewaschen und darauffolgend mit 1% BSA geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers für 10 min. Dem folgte ein zweiter Waschvorgang mit TBST und die Inkubation mit einem an dem Primärantikörper bindenden Sekundärantikörper für wiederum 10 min. Nach erneutem Waschvorgang erfolgte die Bildaufnahme. Dazu wurde die Membran in den Chemilumineszenzdetektor gelegt und mit vorher zu gleichen Teilen aus Luminol/Enhancer und *Stable Peroxide Buffer* gemischter Chemilumineszenzlösung benetzt. Die Detektion der Membran durch eine Licht-sensitive Kamera erfolgte mit der Software FUSION-CAPT 15.5. Nach der Detektion der Membran wurde diese in TBST bei 4°C im Kühlraum aufbewahrt, um bei Bedarf ein Stripping und eine neue Färbung zu ermöglichen. Die Quantifizierung der optischen Dichte der erhaltenen Banden von den gesuchten Proteinen, erfolgte mittels der Analysesoftware Bio-1D Version 15.01 immer in Relation zu den jeweiligen GAPDH-Banden, die als Ladekontrolle dienten.

#### **3.4.9. RNA-Isolation und RNA-Quantifizierung**

Die RNA-Extraktion wurde mit dem *RNeasy® Mini Kit* (250) durchgeführt. Zunächst wurden die Proben des *M. gastrocnemius* in *Lysing Matrix M-Reaktionsgefäße* (MP Biomedicals) überführt, 200 µl Qiazol hinzugegeben und daraufhin für 20s in dem *MP FastPrep®-24* bearbeitet. Anschließend wurden 500 µl Qiazol auf die Proben gegeben und diese erneut für 20 s in das *FastPrep®-24* gestellt, um das Gewebe mechanisch aufzuschließen. Durch Zugabe von 140 µl Chloroform und Mischen wurde die RNA von restlichen Gewebebestandteilen getrennt und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Nach Zentrifugation (15 min /12000 rpm / 4°C), wurde die wässrige Phase, die die gelöste RNA enthält, abgenommen und mit 550 µl 70%igem Ethanol (Roth) vermischt.

Die folgenden Schritte bis zur kompletten Isolation der völlig aufgereinigten RNA, entsprechen denjenigen des Herstellers aus dem Protokoll des *RNeasy®Mini Kits*. Um die RNA aus der Säule zu lösen, war die Zugabe von 20-30 µl RNase-freiem Wasser und eine anschließende Zentrifugation notwendig.

#### *Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration*

Von dem im Reaktionsgefäß aufgefangenem RNA-Extrakt wurde photometrisch die RNA-Konzentration bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Als Leerwert dienten 99 µl RNase freies Wasser. Die RNA-Proben wurden 1:100 mit RNase freiem Wasser verdünnt. Als Kontrolle der Reinheit der Probe wurde darauf geachtet, dass die Extinktionskoeffizienten  $E_{260}/E_{230}$  und  $E_{260}/E_{280}$  um nicht mehr als 0,5 von dem Wert 2 abweichen, um zu große Verunreinigungen der gewonnenen RNA zu vermeiden. Die Proben wurden sodann direkt weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert.

#### **3.4.10. cDNA-Synthese**

Um die extrahierte RNA für die qRT-PCR nutzen zu können, wurde sie zunächst in cDNA umgeschrieben. Dazukam das *iScript™ cDNA Synthesis Kit* zum Einsatz. Die cDNA-Synthese wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Proben und der im *Kit* enthaltende Reaktionsmix wurden auf Eis aufgetaut und alle weiteren Schritte wurden ebenso auf Eis ausgeführt. Eingesetzt wurden jeweils 100-500 ng RNA (auf 15 µl mit RNase freiem Wasser aufgefüllt), 4 µl Reaktionsmix und 1 µl Reverse Transkriptase für ein Totalvolumen von 20 µl. Die Inkubation erfolgte im Thermocycler nach dem Schema aus *Tabelle 2*. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Proben bei -20°C gelagert.

cDNA-Synthese	
<b>5 Minuten</b>	bei 25 °C
<b>30 Minuten</b>	bei 42 °C
<b>5 Minuten</b>	bei 85 °C

*Tabelle 2: Länge der Zyklen für die cDNA-Synthese*

#### **3.4.11. Quantitative Polymerase Ketten Reaktion**

Die Analyse der Expression mitochondrialer Enzyme sowie Autophagie-spezifischer Proteine, erfolgte durch qRT-PCR bei der die aus Gesamt-RNA umgeschriebene cDNA zur Anwendung kam. Hierfür wurde das *SsoFast™ EvaGreen® Supermix Kit* eingesetzt. Alle Schritte wurden nach Herstellerprotokoll und stets auf Eis durchgeführt. Die Reaktionen wurden in 96-Well-PCR-Platten mit einem jeweiligen Gesamtvolumen von 20 µl vollzogen. Es wurden 1 µl cDNA-Probe und 19 µl eines in einem separaten Eppendorf-Röhrchen

vorbereitetem *Master Mix* eingesetzt. Der *Master Mix* setzte sich folgendermaßen zusammen:

Master Mix	
10 µl	SsoFast™EvaGreen® Supermix
2 µl	Primer
7 µl	Nuklease freies Wasser

Tabelle 3: Eingesetzte Mengen an Reagenzien für den Master Mix

Der *Master Mix* wurde sowohl für das gesuchte Gen, als auch für ein Haushaltsgen angefertigt, um im Nachhinein eine Normalisierung der Proben zu ermöglichen. Die Proben wurden jeweils als Triplikate angesetzt. Bei jedem Lauf wurde sowohl eine Reinheitskontrolle von 1 µl Nuklease freiem Wasser an Stelle der *cDNA* als auch eine Standardreihe mitgeführt, die ausgehend von einer der *cDNA*-Proben, in den Verdünnungen 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 in Nuklease freiem Wasser angefertigt wurde. Die Bestimmung der Effizienz des Laufes erfolgte anhand der Standardkurve. Nach Fertigstellen der jeweiligen Platte, wurde diese mit einer passenden transparenten Abdeckfolie abgeklebt, kurz zentrifugiert (2 min/ 4 °C/ 1000 rpm) und in einem *qRT-PCR-Cycler* nach dem Schema aus Tabelle 3 gemessen.

Programmschritt	Zeit	Temperatur
Initiale Enzymaktivierung	30 s	95°C
Denaturierung	5 s	95°C
Anlagerung/Synthese	5 s	55°C
Schmelzkurve	5 s per 0,5 °C	65-95°C
Ab Schritt 2 insgesamt 45 Zyklen (ohne Schmelzkurve)		

Tabelle 4: Länge der Zyklen bei den durchgeführten qRT-PCR

Die Auswertung der Daten erfolgte am PC mit der Software CFX Manager™ Version 1.6, welche automatisch die Schwellenwert-Zyklus-Werte (C(t)) der einzelnen Proben angab. Aus den Mittelwerten der erhaltenen C(t)-Werten wurde mit Hilfe der Software GenEX5 die relative Expression der mRNA in den jeweiligen Versuchstieren berechnet.

### 3.4.12. Immunhistochemie

Für die Anfertigung immunhistochemischer Präparate wurden die zuvor in 4%igem Formalin fixierten und anschließend in Paraffin eingebetteten Präparate der *Mm. tibialis anteriores* verwendet. In einem Brutschrank, wurde das restliche auf den Schnittpräparaten haftende Paraffin bei 60 °C für 30 min abgeschmolzen. Zum weiteren Dehydrieren wurden die Präparate durch eine absteigenden Alkoholreihe (4x Xylol, 2x 100% EtOH, 1x 80% EtOH, 2x 70% EtOH, 1x destilliertes Wasser, jeweils für 5 min) geführt. Anschließend wurden die

Präparate in Citratpuffer(10mM, pH6) getränkt und für 20 min in der Mikrowelle gekocht, um eine Antigendemaskierung, das heißt, das Lösen der Quervernetzungen zwischen Proteinen, die durch Fixierung entstanden sind, zu bewirken.

Nun ließ man die Präparate im Citratpuffer auf Eis gestellt 20 min abkühlen. Nach einem weiteren Waschschrift (2x je 5 min PBS) wurden zum Blocken der endogenen Peroxidasen die Präparate für 10 min in eine Methanol-Lösung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gestellt (180 ml 100% Methanol+ 20 ml 30%ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Ein weiterer Waschschrift (2x je 5 min PBS) folgte und anschließend wurden die Präparate jeweils mit einem *Pap-Pen* eingekreist und für 30 min mit Blockserum in einer feuchten Kammer geblockt, um ein Verdunsten des Blockserums zu vermeiden. Das Serum entstammte dem *VECTAstain Elite ABC Kit* und wurde in einem Verhältnis von 1: 66,67 mit PBS angesetzt. Nachdem das Blockserum entfernt wurde, wurde der primäre Antikörper mit einer Verdünnung von 1:10000 auf die Präparate aufgetragen. Der Antikörper wurde mit Antikörper-Diluent verdünnt. Die Präparate wurden dann in einer feuchten Kammer platziert und für 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der primäre Antikörper abgetropft und die Präparate erneut gewaschen (2x je 5 min PBS). Im Folgenden wurde der Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen) für 30 min bei Raumtemperatur auf die Präparate gegeben. Dieser setzte sich folgendermaßen zusammen: Sekundärantikörper und PBS in einem Verhältnis 1: 200, Blockserum und PBS in einem Verhältnis von 1: 66,7. Ein weiterer Waschschrift folgte (2x je 5 min PBS) und im Anschluss wurde für 30 min das ABC-Reagenz aufgetragen, dass schon 30 min zuvor angesetzt wurde und aus dem Reagenz A, dem Reagenz B und PBS in einem Verhältnis von jeweils 1:50 angefertigt wurde. Es wurde nun der letzte Waschschrift (2x je 5 min PBS) durchgeführt.

Um die Farbentwicklung, die durch die Reaktion der Antikörper mit dem DAB-Reagenz zustande kommt, unter dem Mikroskop zu beobachten, wurde eines der Präparate in der geringsten Vergrößerung betrachtet und dabei mit DAB-Reagenz benetzt, welches zuvor aus DAB-Substrat und Substratpuffer in einem Verhältnis von 1:50 angesetzt wurde. Sobald das Präparat intensiv braun angefärbt war, wurde die DAB-Reaktion gestoppt, indem das Präparat in Leitungswasser gestellt wurde. Dabei wurde die Zeit bis zur optimalen Braunfärbung gestoppt. Dieses Verfahren wurde im Anschluss für alle Präparate durchgeführt, indem das DAB-Reagenz für die zuvor bestimmte entsprechende Zeit auf die Präparate gegeben wurde. Nachdem die Präparate danach 5 min im Leitungswasser verblieben, wurden sie für weitere 5 min in destilliertes Wasser gestellt. Im Anschluss erfolgte die Gegenfärbung der Präparate. Dazu wurden sie 40 s lang in mit destilliertem Wasser verdünntes Hämalun (1:10 Verdünnung) gestellt und darauffolgend für 7 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Zuletzt wurden die Präparate durch eine aufsteigende Alkoholreihe geführt (2x 70% EtOH, 1x 85% EtOH, 2x 100% EtOH, 4x Xylol, jeweils für 5

min) und im Anschluss mit Hilfe von Histokitt-Einschlussmedium und Deckgläsern eingedeckt. Beim Eindecken wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen auf den Objektträgern entstehen.

Alle Reagenzien wurden mit einem Volumen von jeweils 100 µl auf die Präparate gegeben. Bei jeder Färbung wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, bei der die Inkubation mit dem Primärantikörper fehlte. Diese diente dem Aufdecken potenziell vorhandener unspezifischer Bindungen mit anderen Serumproteinen.

Pro Versuchsgruppe wurden immer vier Schnittpräparate in 400- sowie in 640-facher Vergrößerung betrachtet. Dabei wurden mittels der Software *ImageJ* Version 1.48p die RGB-Werte bestimmt und damit die Unterschiede in der Verteilung und des Gehaltes des MAP1LC3B-Proteins festgestellt.

### 3.4.13. Transmissionselektronenmikroskopie

Die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Präparate und Bilder erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg, sowie dem Institut für Anatomie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg. Dabei wurde Muskelgewebe des jeweils rechten *M. gastrocnemius* und *soleus* in 2.5 % Glutaraldehyd, 1.25 % (Para-)Formaldehyd (PFA) und 2 mM Pikrinsäure (in 0.1 M Kakodylat Puffer [pH 7.0]) fixiert. Hiernach erfolgte eine Postfixierung in 1% Osmiumtetroxid und die Dehydrierung mittels Ethanol/Propylenoxid. Danach wurde das Muskelgewebe in Glycid-Ether 100 (EPON 812, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg) in longitudinaler Ausrichtung eingebettet. Im Anschluss wurden ultradünne Schnitte (60–80 nm) auf Kupfergitter montiert und mit 4%-igem Uranylacetat kontrastiert und im Elektronenmikroskop (Zeiss EM 10 C TEM (Carl Zeiss AG, Oberkochen)) betrachtet. Die Analysen wurden mit dem Programm *Image SP System* (SYSPROG, Minsk, Belarus) durchgeführt.

### 3.4.14. Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Daten wurden die Programme *Graph Pad Prism 5*, *REST 2009* und *EXCEL 2010* verwendet. Die Signifikanz der Werte wurde, je nach Erfordernis mittels T-Test berechnet. P-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet. Wenn nicht anders angegeben, handelt es sich bei den in den Diagrammen dargestellten Werten um Mittelwerte. Die Fehlerbalken wurden als SEM dargestellt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Auswertung der Blutgasanalysen

Da in humanen Blutproben von Patienten mit FMS Hinweise auf Veränderungen in der Zusammensetzung des Blutes vernommen werden konnten, wurden spezifische Blutgaswerte der ICS-Mäuse auf Unterschiede im Vergleich zu den Kontrolltieren untersucht. Die männlichen Versuchstiere aus der ICS-Gruppe zeigten eine signifikante Erhöhung des CO<sub>2</sub> von 35,20 mmHg zu 45,05 mmHg. Ebenso zeigte sich bei den Natriumwerten eine 1,2 fache Erhöhung von 147,71 mmol/L auf 190,83 mmol/L. Zudem konnte eine Erniedrigung des Glucose- Blutwertes (von 129,29 mg/dL auf 84,50 mg/dL) als auch des Chlorid-Wertes (von 101,71 mmol/L auf 78,33 mmol/L) in ICS-Mäusen festgestellt werden (*Tabelle 5*).

Die weiblichen Versuchstiere aus der ICS-Gruppe zeigten ebenso wie die männlichen Tiere eine Erhöhung des CO<sub>2</sub> (von 25,84 mmHg auf 32,06 mmHg). Außerdem konnte eine signifikante Erhöhung von Kalium (von 3,30 mmol/L auf 4,30 mmol/L) und ein 1,2 fache Erhöhung des Calcium-Wertes (von 0,23 mmol/L auf 0,27 mmol/L) vernommen werden. Darüber hinaus wurde eine signifikante Erniedrigung des Methämoglobins (von 2,10 % auf 1,08 %) und eine Reduktion des O<sub>2</sub>- Gehaltes (von 72, 40 mmHg auf 64,20 mmHg) beobachtet (*Tabelle 5*). Sowohl männliche als auch weibliche Versuchstiere aus der ICS-Gruppe wiesen damit eine signifikante Erhöhung des CO<sub>2</sub> –Gehaltes auf.

	Männliche Tiere		Weibliche Tiere	
	Kontrolle	ICS	Kontrolle	ICS
<b>CO<sub>2</sub></b> [mmHg]	35,20 ± 2,80	45,05* ± 3,53	25,84 ± 1,35	32,06 ± 2,76
<b>Na<sup>+</sup></b> [mmol/L]	147,71 ± 2,12	190,83* ± 17,83	148,50 ± 0,71	150,22 ± 0,46
<b>Glucose</b> [mg/dl]	129,29 ± 15,60	84,50 ± 13,21	62,00 ± 6,61	66,33 ± 6,91
<b>Cl<sup>-</sup></b> [mmol/L]	101,71 ± 2,95	78,33 ± 11,66	97,00 ± 0,91	98,22 ± 1,22
<b>K<sup>+</sup></b> [mmol/L]	5,81 ± 1,61	5,48 ± 2,22	3,30 ± 0,13	4,30* ± 0,25
<b>Ca<sup>2+</sup></b> [mmol/L]	0,48 ± 0,11	0,59 ± 0,21	0,23 ± 0,00	0,27 ± 0,01
<b>MetHb</b> [%]	0,16 ± 0,22	nd ± 0,05	2,10 ± 0,37	1,08* ± 0,29
<b>O<sub>2</sub></b> [mmHg]	62,14 ± 12,15	69,03 ± 14,10	72,40 ± 4,89	64,20 ± 7,10

**Tabelle 5: Blutgasanalyse aus Blutproben von C57BL/6J Mäusen.**

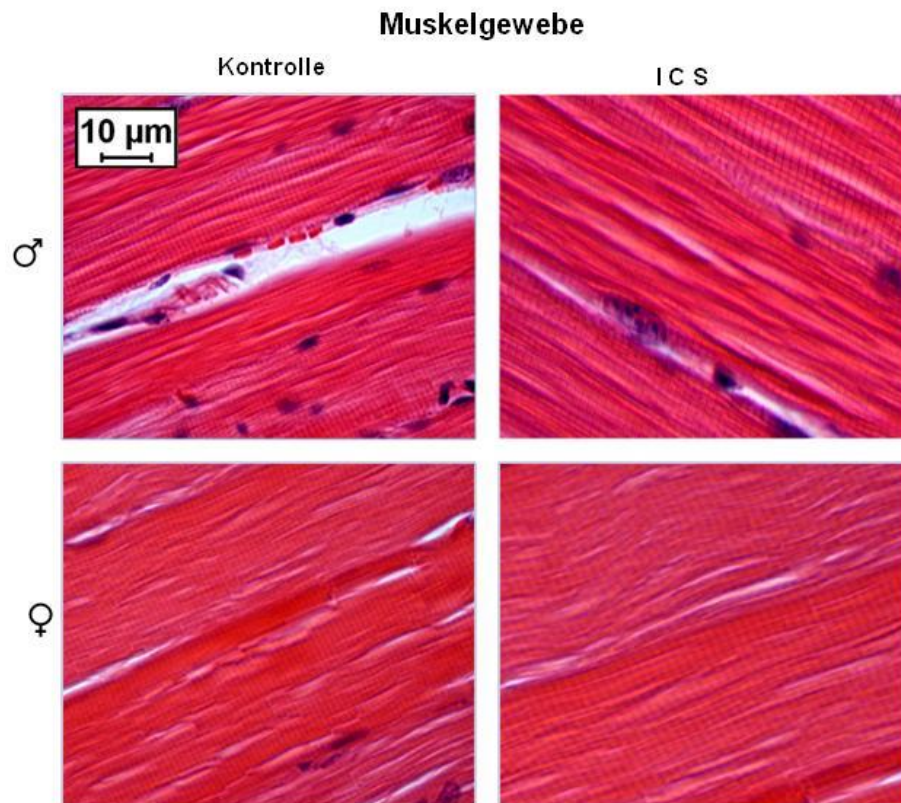
Darstellung der Mittelwerte ± SEM ausgewählter Blutgase und Blutparameter. Signifikante Werte sind mit \* gekennzeichnet. nd = nicht definierbarer Wert.

## 4.2. Lichtmikroskopische Untersuchungen des Muskelgewebes und der Sarkomerlänge in C57BL/6JMäusen

Durch vorherige Studien konnten Störungen der Muskulatur in Muskelbiopsien von Fibromyalgie-Patienten nachgewiesen werden. Die Muskulatur schien in ihrer Struktur zerstört und wies Läsionen auf. Aktin- und Myosinfilamente lagen ungeordnet vor und die sonst so regelmäßigen Z-Linien waren in ihrer Abfolge unterbrochen [55, 56]. Auf Grund dessen wurde in dieser Arbeit Muskelgewebe vor allem im Hinblick auf Veränderungen der Sarkomerlänge und auch der Muskelstruktur untersucht.

Dazu wurden histologisch angefertigte Präparate des linken *M. tibialis anterior* HE-gefärbt und unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Bezüglich der Muskelstruktur konnten keinerlei Unterschiede zwischen Kontrolltieren und ICS-Mäusen festgestellt werden. Die Muskulatur erschien in beiden Tiergruppen in vergleichbarem Zustand bezüglich Struktur und Regelmäßigkeit der Myofibrillen. Ebenso waren keine Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Mäusen zu vernehmen (*Abbildung 7*).

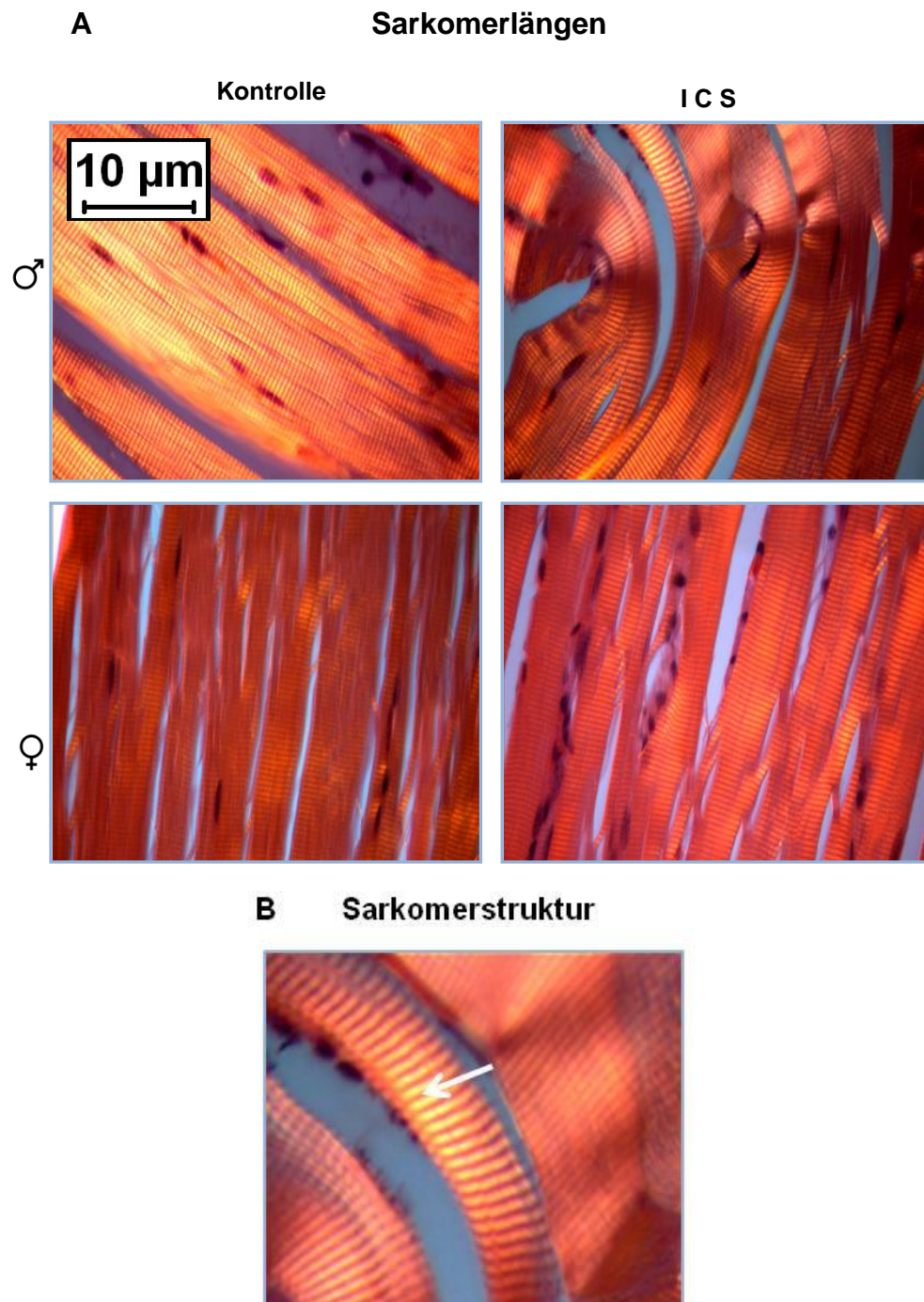




**Abbildung 7: Lichtmikroskopische Aufnahmen HE-gefärbter Muskelpräparate.**

Präparate des linken *M. tibialis anterior* männlicher und weiblicher Kontroll- und ICS-Tiere, dargestellt in 400-facher Vergrößerung.

Zur deutlicheren Veranschaulichung der Sarkomerstrukturen, kam es zum Einsatz eines Polarisationsfilters, um einen differenzierteren Interferenzkontrast herzustellen (*Abbildung 8*).

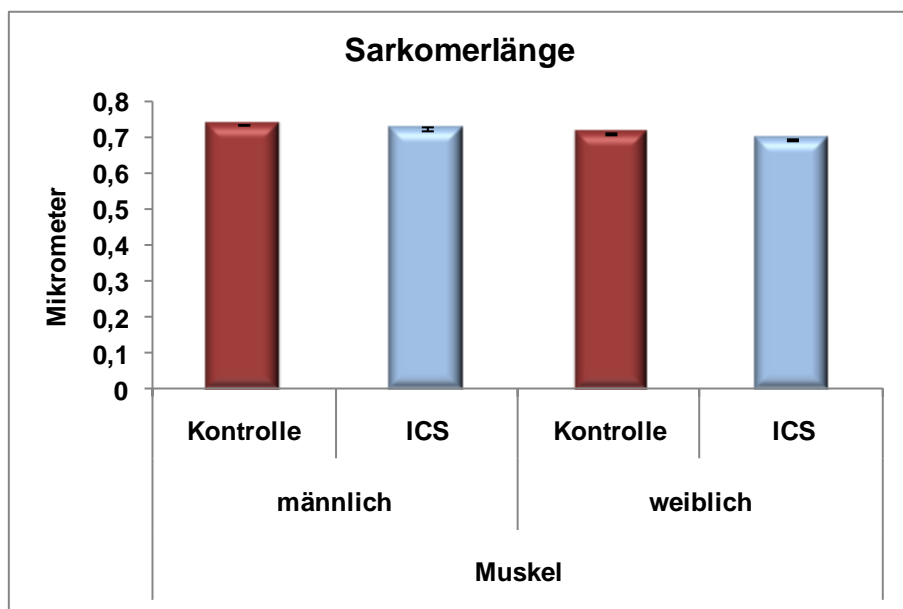


**Abbildung 8: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Sarkomerstrukturen.**

A HE-gefärbten Präparate des linken *M. tibialis anterior* von Kontroll- und ICS-Mäusen. Darstellung unter Verwendung eines Polarisationsfilters (POL-Filter). 630-fache Vergrößerung. B Verdeutlichung des Abstandes zwischen zwei Sarkomeren. Der Pfeil markiert den Bereich, der für die Analysen ausgemessen wurde.

Um die Sarkomerlängen in den Muskelpräparaten auszuwerten, wurde in mehreren Bereichen eines Präparates mit der Messfunktion des Leica QWin3 Programmes die Distanzen zwischen den Sarkomeren in  $\mu\text{m}$  ausgemessen. Zur deutlicheren Veranschaulichung der Sarkomerstrukturen, kam es zum Einsatz eines Polarisationsfilters, um einen differenzierteren Interferenzkontrast herzustellen. Bei der alleinigen Betrachtung der Präparate konnten ebenfalls keine Unterschiede zwischen Kontroll- und ICS-Tieren

wahrgenommen werden; die Sarkomere bildeten sich in allen Präparaten regelmäßig ab (*Abbildung 8*). *Abbildung 8 B* verdeutlicht dabei den intersarkomer-Bereich, der für die Analyse ausgemessen wurde. Die hellen Streifen stellen die Sarkomere dar, die dunkleren Streifen den Abstand zwischen den Sarkomeren. Die gemessenen Abstände zwischen den Sarkomeren hielten sich ebenso durchweg im gleichen Wertebereich auf (*Abbildung 9*).



**Abbildung 9: Statistische Auswertung der Sarkomerlängen in Muskelpräparaten.**

Beurteilung der Sarkomerlängen in HE-gefärbten Schnittpräparaten des *M. tibialis anterior*. Die Präparate wurden in 630-facher Vergrößerung betrachtet. In fünf verschiedenen Bereichen jedes Schnittpräparates wurden jeweils 20 Sarkomerlängen in  $\mu\text{m}$  ausgemessen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

#### 4.3. Metabolische Veränderungen in C57BL/6J Mäusen unter dem Einfluss intermittierendem Kältestresses

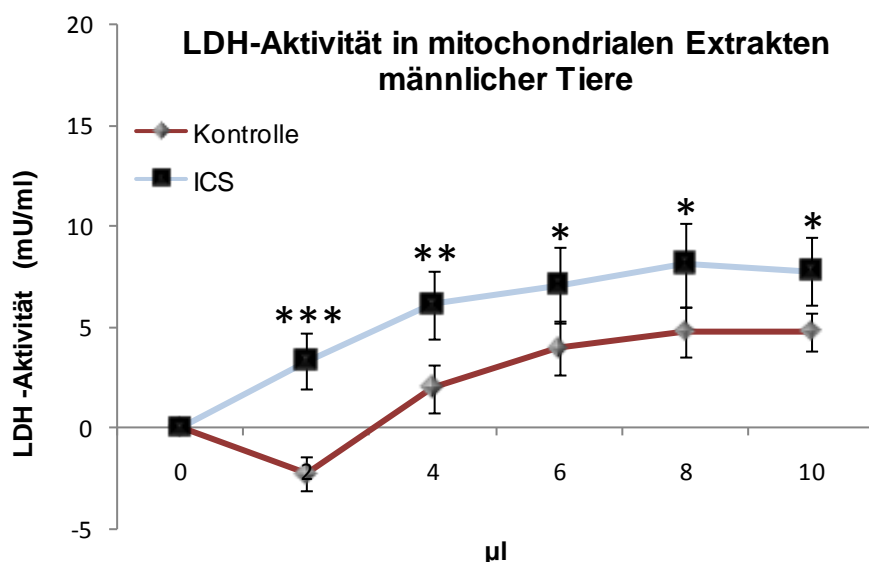
An einer Gruppe von Patienten mit FMS konnten biochemische Veränderungen sowie deutliche Veränderungen in Hinsicht auf den Glucose-Stoffwechsel festgestellt werden [94], daher wurde hier die Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) bestimmt. Die LDH ist ein für den Energiemetabolismus der Zelle essentielles Enzym, welches unter anderem die Umwandlung von Laktat in Pyruvat katalysiert. Zudem spielt sie auch bei der Bereitstellung von NADH, als wichtigem Kofaktor und Energieträger der Zelle eine unabdingbare Rolle. Nicht nur im Hinblick auf das Zusammenspiel des Energiestoffwechsels der Zelle sondern auch aufgrund Beobachtungen bezüglich Deposition und Akkumulation von Glykogenspeichern bei Patienten mit FMS, wurde in dieser Arbeit auch der Glykogengehalt sowohl im Muskel- als auch im Lebergewebe von C57BL/6J Mäusen bestimmt.

### 4.3.1. Messung der Lactatdehydrogenase-Aktivität in mitochondrialen

#### Proben von C57BL/6J Mäusen

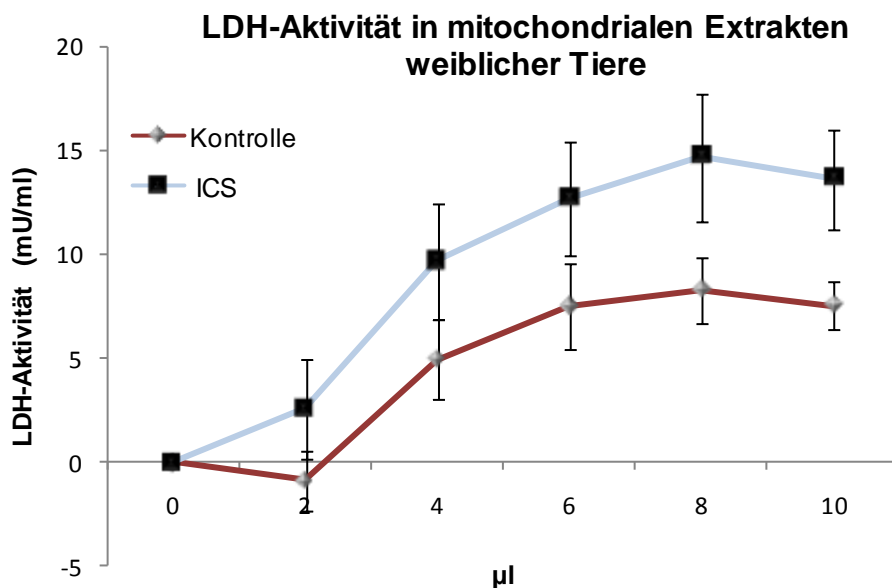
In der Literatur ist die Lactatdehydrogenase- Aktivität (LDH-Aktivität) als ein Maß für Zellzerfall bekannt. Eine Erhöhung der Aktivität der LDH im Serum indiziert damit, dass intrazelluläre Komponenten (einschließlich LDH) in größeren Mengen in die Zirkulation abgesondert werden. Zusätzlich ist die Messung der LDH-Aktivität ein Goldstandard in der Beurteilung von vorliegendem Zellstress. In diesem Versuch wurde die LDH-Aktivität allerdings in einem anderen Zusammenhang beurteilt. Die Messungen erfolgten mit Hilfe eines Assays, der über eine kolorimetrische Reaktion die Aktivität der LDH in mitochondrialen Extrakten bestimmte und damit Auskunft über deren Aktivität lieferte. Da es sich bei der LDH um ein mitochondriales Enzym handelt, gibt die gemessene LDH-Aktivität somit Aufschluss darüber, wie viele Mitochondrien beziehungsweise wie viel aktive LDH in den jeweiligen Proben enthalten sind.

In den Messungen zeigte sich bei den männlichen ICS-Tieren eine Erhöhung der LDH-Aktivität in allen Proben. Dabei fiel für jedes Volumen die Erhöhung der Enzymaktivität signifikant aus (*Abbildung 10*). Die weiblichen ICS-Tiere zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren ebenso eine deutliche Erhöhung der LDH-Aktivität, die allerdings nicht signifikant war (*Abbildung 11*).



**Abbildung 10: LDH-Aktivität in mitochondrialen Extrakten männlicher C57BL/6J Mäusen.**

Die Aktivität wurde aus mitochondrialen Extrakten bestimmt, die zuvor aus dem linken *M. quadriceps femoris* isoliert wurden (siehe Material und Methoden). Die Aktivität wurde in verschiedenen Volumina mitochondrialer Extrakte gemessen, um zu gewährleisten, dass die Ergebnisse innerhalb der Standardkurve liegen. Die Messungen wurden als Triplikate durchgeführt. Jeder Kontrollwert wurde mit dem zugehörigen ICS-Wert verglichen. Die Punkte stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM dar. p-Werte < 0,05 = \*, p < 0,01 = \*\*, p < 0,001 = \*\*\*.



**Abbildung 11: LDH-Aktivität in mitochondrialen Extrakten weiblicher C57BL/6J Mäusen.**

Die Aktivität wurde aus mitochondrialen Extrakten bestimmt, die zuvor aus dem linken *M. quadriceps femoris* isoliert wurden (siehe Material und Methoden). Die Aktivität wurde in verschiedenen Mengen mitochondrialer Extrakte gemessen, um zu gewährleisten, dass die Ergebnisse innerhalb der Standardkurve liegen. Die Messungen wurden als Triplikate durchgeführt. Jeder Kontrollwert wurde mit dem zugehörigen ICS-Wert verglichen. Die Punkte stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM dar.

#### 4.3.2. Glykogengehalt in Muskel- und Leberpräparaten von C57BL/6J

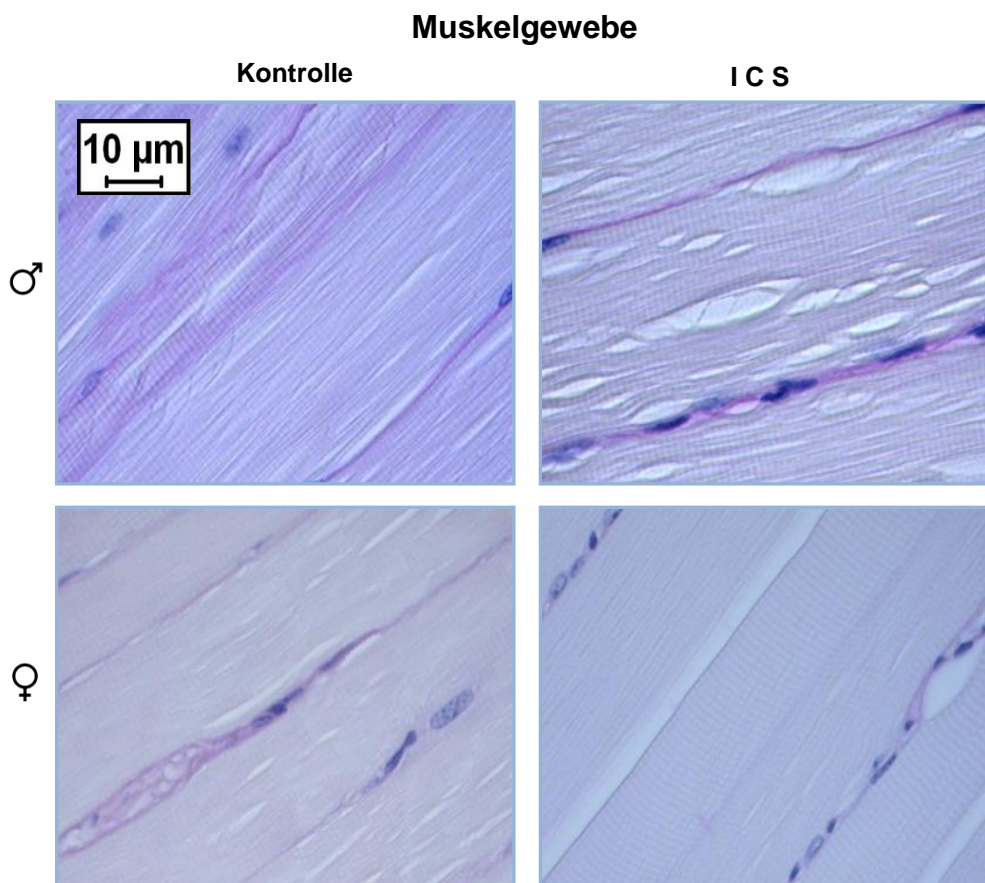
##### Mäusen

Um den Glykogengehalt in Muskelpräparaten zu bestimmen, wurden histologische Präparate des linken *M. quadriceps femoris* PAS-gefärbt und im Lichtmikroskop betrachtet. Der Glykogengehalt wurde in 3 Bereichen eines Präparates bestimmt. Pro Versuchsgruppe wurden 3 verschiedene Schnittpräparate in einer 400-fachen Vergrößerung betrachtet und in diesen mittels der Software *ImageJ* Version 1.48p die RGB-Werte bestimmt, die auf den Glykogenanteil schließen ließen.

Dabei zeigte sich bei den männlichen Versuchstieren der ICS-Gruppe bei alleiniger Betrachtung der lichtmikroskopischen Bilder keine mit dem Auge sichtbare Veränderung des Glykogengehaltes im Vergleich zu der Kontrollgruppe (*Abbildung 12*).

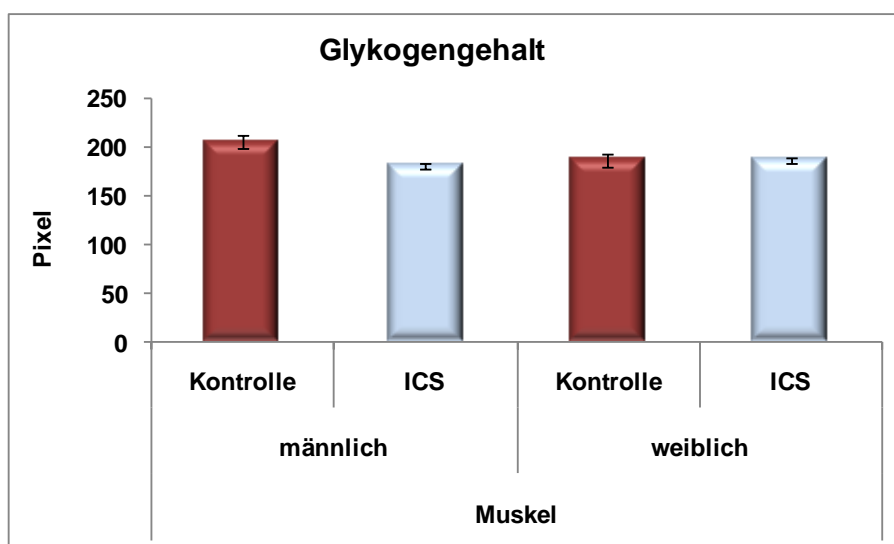
Die Quantifizierung der Ergebnisse wies allerdings eine schwache Erniedrigung des Glykogengehaltes in den ICS-Mäusen auf (*Abbildung 13*).





**Abbildung 12: Lichtmikroskopische Aufnahmen PAS-gefärbter Muskelpräparate.**

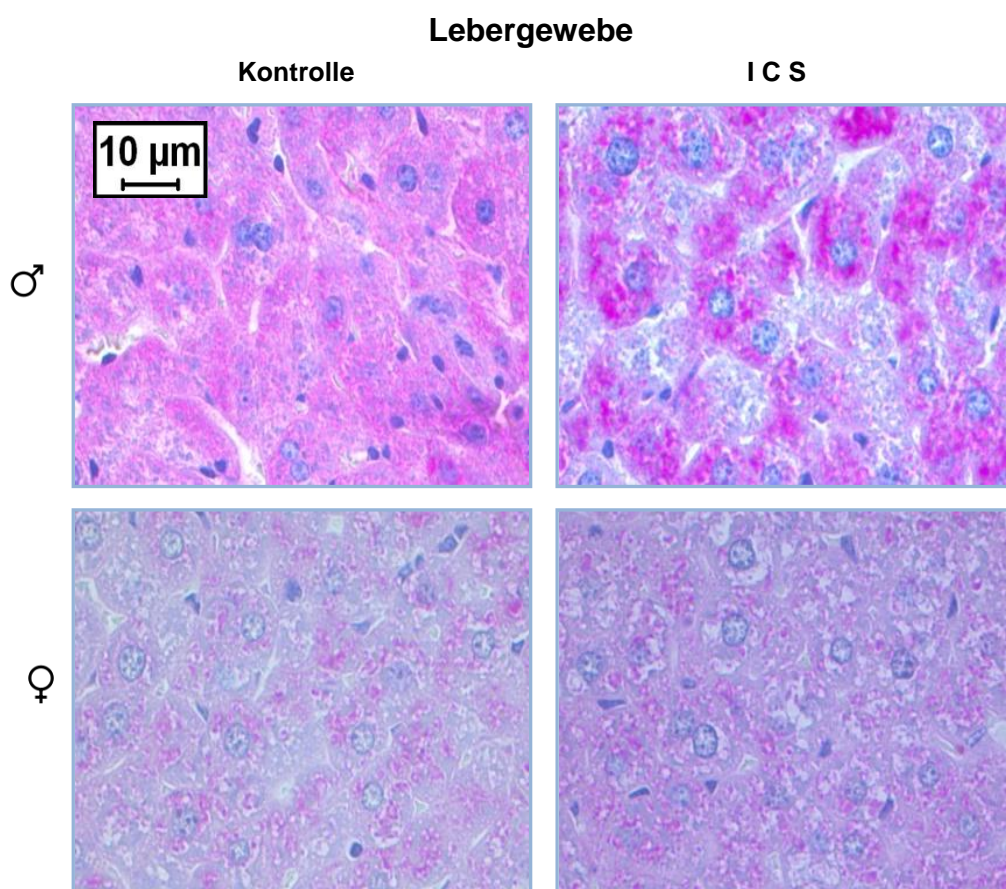
Präparate des linken *M. tibialis anterior* männlicher und weiblicher Kontroll- und ICS-Mäuse, dargestellt in 400-facher Vergrößerung.



**Abbildung 13: Quantifizierung des Glykogengehaltes in Muskelpräparaten.**

Beurteilung des Glykogengehaltes in PAS-gefärbten Schnittpräparaten des *M. tibialis anterior* männlicher und weiblicher Kontroll- und ICS-Mäuse. Die Präparate wurden in 400-facher Vergrößerung betrachtet. Mittels RGB-Wert-Bestimmung konnte der Glykogengehalt beurteilt werden. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$ SEM.

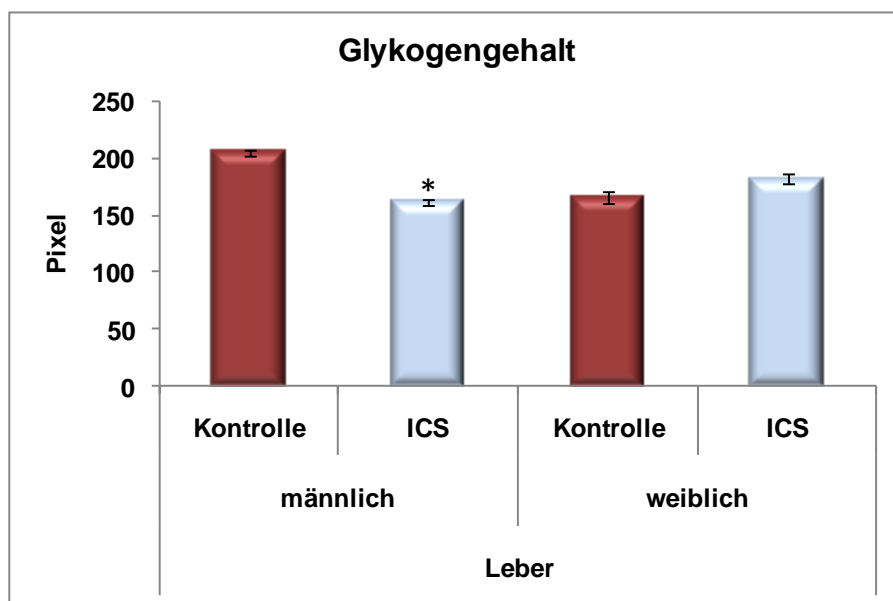
Bei den weiblichen Mäusen zeigte hingegen der Vergleich von ICS- und Kontrolltieren sowohl lichtmikroskopisch als auch nach Quantifizierung keine Unterschiede im Glykogengehalt des Muskelgewebes, sondern blieb konstant (*Abbildung 12, Abbildung 13*). Ebenso wurden auch Leberpräparate histologisch angefertigt und PAS-gefärbt um die Glykogenverteilung beurteilen zu können. Hier wurde ebenfalls nach dem obig beschriebenen Prinzip gearbeitet. Dabei zeigte sich in den Präparaten der männlichen Kontrolltiere im Gegensatz zu den ICS-Tieren eine gleichmäßig über die Zellen verteilte Färbung (*Abbildung 14*).



**Abbildung 14: Lichtmikroskopische Aufnahmen PAS-gefärbter Leberpräparate.**

Präparate des rechten Leberlappens männlicher und weiblicher Kontroll- und ICS-Mäuse, dargestellt in 400-facher Vergrößerung.

Die Quantifizierung der Ergebnisse ergab eine signifikante Verminderung des Glykogengehaltes im Lebergewebe der männlichen ICS-Tiere (*Abbildung 15*).



**Abbildung 15: Quantifizierung des Glykogengehaltes in Leberpräparaten.**

Beurteilung des Glykogengehaltes in PAS-gefärbten Schnittpräparaten einer Probe des rechten Leberlappens männlicher und weiblicher Kontroll- und ICS-Mäuse. Die Präparate wurden in 400-facher Vergrößerung betrachtet. Mittels RGB-Wert-Bestimmung konnte der Glykogengehalt beurteilt werden. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$ SEM.  $p < 0,05 = *$ .

Bei den weiblichen Mäusen andererseits, konnte wie auch schon den Glykogengehalt im Muskelgewebe betreffend, keinerlei Unterschiede in der Verteilung oder bezüglich des Gehaltes zwischen ICS- und Kontrolltieren festgestellt werden (*Abbildung 14, Abbildung 15*).

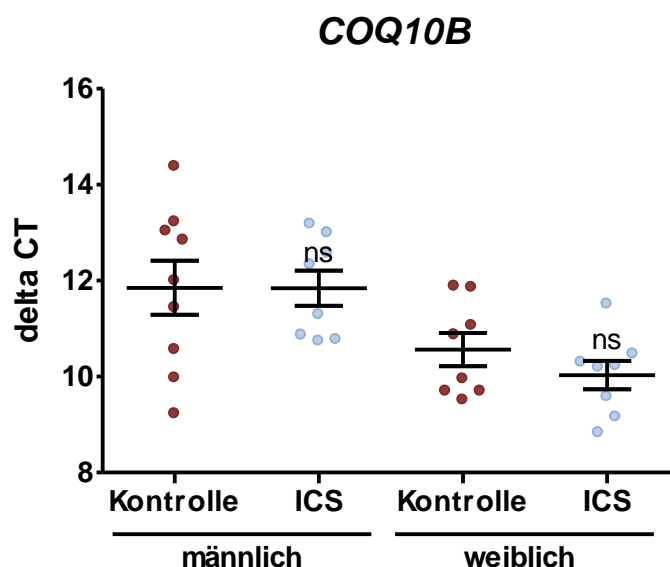
#### 4.4. Analyse der Expression von COQ10 und COX4I1 im ICS-Mausmodell

Zahlreiche Ansätze in der Literatur haben bereits Nachweise geliefert, dass sich im Rahmen des FMS auch Veränderungen auf molekularer Ebene aufzeigen lassen. Dabei spielen vor allen Dingen Veränderungen des mitochondrialen Stoffwechsels sowie auch strukturelle Veränderungen dieser Organellen eine entscheidende Rolle. Besonders wurden Alterationen im Gehalt von Proteinen nachgewiesen, die innerhalb der Atmungskette an der Energieproduktion beteiligt sind [59]. Zudem konnte auch festgestellt werden, dass mit Bezug zum FMS eine Dysfunktion der Mitochondrien vorliegen kann, die sich nicht nur morphologisch zeigt, sondern auch über vermehrten oxidativen Stress, der durch unterschiedlichste Schäden der Mitochondrien ausgelöst werden kann [95]. Um die Auswirkungen des intermittierenden Kältestresses auf mitochondriale Prozesse der Muskelzellen von C57BL/6J Mäusen zu erfassen, wurde die Expression von COQ10B und COX4I1 als zwei essentielle mitochondriale Enzyme sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene mittels qRT-PCR und Western Blot untersucht.



#### 4.4.1. Verteilung und Expression von COQ10B und COX4I1

Wie bereits erwähnt, können Schwankungen des COQ10-Gehaltes in Zellen zur Beurteilung der mitochondrialen Integrität dienen [57, 96]. Um die Genexpression von *Coq10b* zu bestimmen, wurde aus Gewebeproben des linken *M. gastrocnemius* eine qRT-PCR durchgeführt. *Abbildung 16* zeigt die relative Expression des Transkriptes von *Coq10b*. Dargestellt sind Delta CT-Werte, die sich rechnerisch ergeben, wenn von dem Gen, dessen Expression untersucht werden soll, der zugehörige Wert des *housekeeping genes* abgezogen wird. Diese Berechnung ermöglicht damit Pipettierungenauigkeiten und biologische Schwankungen in den jeweiligen Proben innerhalb Kontroll- und ICS-Gruppe gerecht zu werden. Damit stellt die Abnahme des Delta CT-Wertes eine Zunahme des Transkriptes und entspricht somit einer verstärkten Expression des Gens. Es ist zu erkennen, dass männliche ICS-Tiere eine relativ konstante Expression und weibliche ICS-Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe eine minimal erhöhte Expression dieses Gens aufzeigten. Statistisch konnte nachgewiesen werden, dass die mittleren Delta CT-Werte von COQ10B bei den männlichen Tieren die dem intermittierendem Kältestress ausgesetzt wurden von 11,85 auf 11,84 ( $p=0,4363$ ) abfielen. Bei den weiblichen Tieren, die ebenso durch Kältestress behandelt wurden, sanken die Delta CT-Werte von 10,57 auf 10,03 ( $p=0,0851$ ), womit die Expression um das 2-fache gestiegen ist

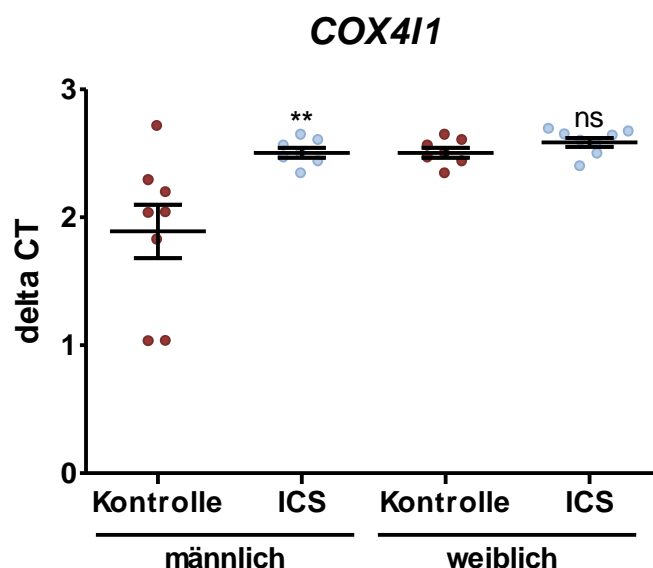


**Abbildung 16: Mittlere Expressionswerte von *Coq10b*.**

Mittels qRT-PCR erworbene Delta CT-Werte der mRNA-Expression. Jede einzelne Messung ist in Form eines Punktes dargestellt. Die Linien stellen die Mittelwerte der Delta CT-Werte  $\pm$  SEM dar. Verglichen wurden die mittleren Delta CT-Werte zwischen unbehandelten Kontrolltieren und ICS-Tieren. ns=nicht signifikant.

Auch die Expression und Verteilung von COX4I1 in einer Zelle kann Aufschluss über die mitochondrialen Funktion liefern.

Die Quantifizierung der zugehörigen mRNA ist in *Abbildung 17* dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die mittleren Delta CT-Werte von *Cox4i1* bei den männlichen ICS-Mäusen von 1,89 auf 2,5 ( $p=0,0037$ ) gestiegen sind und damit eine signifikante und um das 2,6-fach verminderte Expression dieses Gen aufweisen. In den weiblichen ICS-Mäusen hingegen ist keine Variation in der Expression von *Cox4i1* zu erkennen (Delta CT-Wert von 2,50 auf 2,58 gestiegen;  $p=0,08$ ).



**Abbildung 17: Mittlere Expressionswerte von *Cox4i1*.**

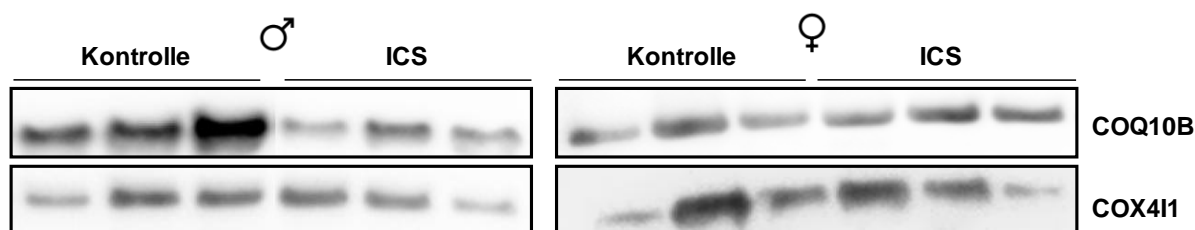
Mittels qRT-PCR erworbene Delta CT-Werte der mRNA-Expression. Jede einzelne Messung ist in Form eines Punktes dargestellt. Die Linien stellen die Mittelwerte der Delta CT-Werte  $\pm$  SEM dar. Verglichen wurden die mittleren Delta CT-Werte zwischen unbehandelten Kontrolltieren und ICS-Tieren.  $p$ -Werte  $<0,01$  = \*\*. ns=nicht signifikant.

Um nicht nur die Veränderungen der mRNA- Expression beurteilen zu können, sondern um auch Abweichungen auf Proteinebene festzustellen, wurden Western Blot- Analysen durchgeführt. Die Proteinverteilung von COQ10B in C57BL/6J Mäusen konnte evaluiert werden, in dem aus mitochondrialen Proben des linken *M. quadriceps femoris* Proteine isoliert wurden und durch Gelelektrophorese aufgetrennt wurden. Nach anschließendem *blotting* der Proteine und Antikörperfärbung konnten die Bandenstärken beurteilt werden. COX4I1 dient, wie aus der Literatur bekannt, für gewöhnlich als Ladekontrolle für mitochondriale Extrakte, da seine Expression unter den meisten experimentellen Bedingungen nicht schwankt [97]. Im vorliegenden Fall, konnte COX4I1 allerdings nicht als Ladekontrolle verwendet werden, da aufgrund der mitochondrialen Schäden keine validen Expressionsmuster erreicht werden konnten.

Unter der Annahme, dass gleiche Proteinmengen beladen wurden, lässt sich erkennen, dass bei den männlichen Tieren, die dem intermittierenden Kältestress ausgesetzt wurden, eine Minderung des Proteingehaltes vorhanden ist. Bei den weiblichen ICS-Tieren hingegen

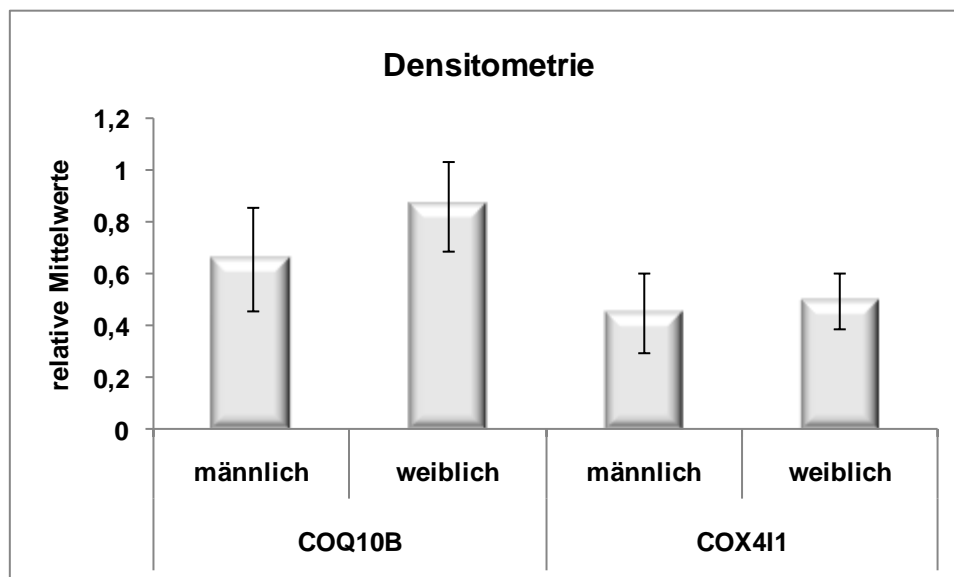
lassen sich bei alleiniger Betrachtung der Bandenstärken keine auffälligen Unterschiede zwischen Kontroll- und ICS-Tieren wahrnehmen (*Abbildung 18*). Densitometrische Analysen bestätigten eine deutliche Reduktion des Proteingehaltes in den Mitochondrien der männlichen ICS-Tiere. Auch bei den weiblichen ICS-Mäusen konnte entgegen Erwartung densitometrisch eine geringfügige Minderung des Proteingehaltes festgestellt werden (*Abbildung 19*).

Bei Betrachtung der Bandenintensitäten von COX4I1, zeigen sich Unregelmäßigkeiten und Unterschiede zwischen Kontroll- und ICS-Mäusen (*Abbildung 18*). Die densitometrischen Auswertungen zeigen sowohl bei den männlichen als auch bei den weiblichen ICS-Mäusen eine deutliche Reduktion des COX4I1-Gehaltes im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen (*Abbildung 19*).



**Abbildung 18: Western Blots für COQ10B und COX4I1.**

Proteinproben wurden aus Mitochondrien des linken *M. quadriceps femoris* von Kontroll- und ICS- Tieren gewonnen. Sowohl bei den männlichen als auch weiblichen ICS-Tieren ist eine Minderung im Proteingehalt von COQ10B zu erkennen. COX4I1 zeigt eine unregelmäßige Verteilung.



**Abbildung 19: Densitometrische Auswertung der Western Blots von COQ10B und COX4I1.**

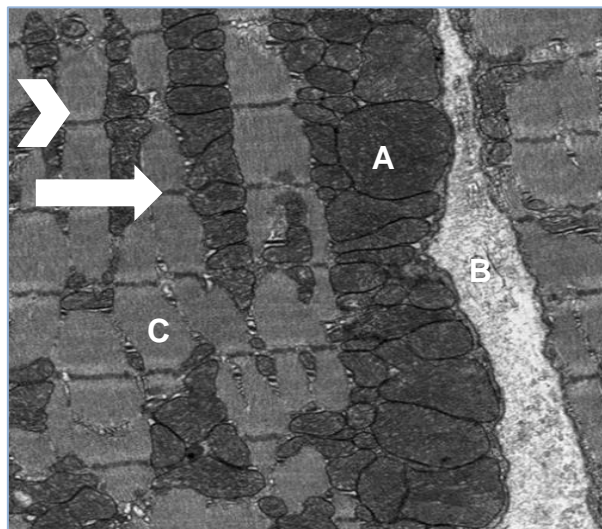
Dargestellt sind die relativen Mittelwerte der semiquantitativen Analyse  $\pm$  SEM. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der Software BIO-1D. Die Kontrollen wurden auf den Wert „1“ gesetzt und die ICS-Tiere dazu in Relation gestellt.

#### 4.5. Ultrastrukturelle Unterschiede in Muskelpräparaten von ICS- und Kontrolltieren

Um herauszufinden, ob intermittierender Kältestress auch Auswirkungen auf ultrastruktureller Ebene hervorruft, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen an unterschiedlichen Muskelgruppen von Kontroll- und ICS- Mäusen durchgeführt.

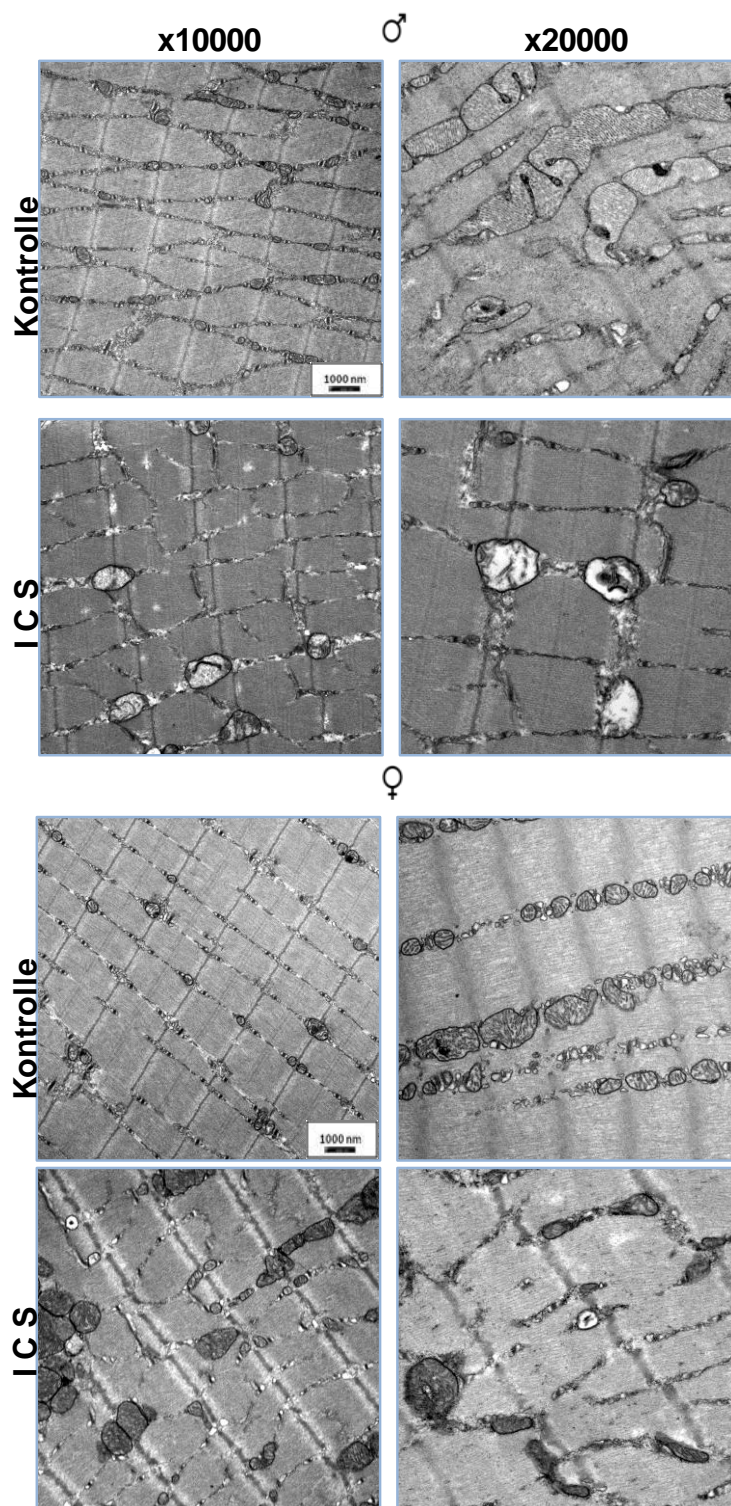
*Abbildung 20* veranschaulicht die Verhältnisse in unbehandelten Kontrollmäusen. Es lässt sich eine typische Ultrastruktur des Muskelgewebes aufweisen. Aktin- und Myosinfilamente zeigen im gesamten Verlauf eine regelmäßige Anordnung, die wiederum eine konstante Organisation der Sarkomere bedingt. Ebenso erscheinen die sogenannten Z- Linien in gleichmäßigen Abständen. Das typische und regelmäßige Arrangement der Mitochondrien am Rande der Muskelfibrillen und im intermyofibrillären Raum ist ebenfalls zu erkennen (*Abbildung 20*).

Bei Betrachtung der Kontrolltiere im Vergleich zu den ICS- Tieren, zeigen sich herausragende Unterschiede. Bei den Kontrolltieren zeigt sich eine regelrecht erscheinende Formstruktur der Mitochondrien (*Abbildung 21, Kontrolle*). Die äußere Mitochondrienmembran ist glatt begrenzt und im Verlauf intakt. Die innere Struktur der Mitochondrien, insbesondere die Cristae, die Invaginationen der inneren Mitochondrienmembran in die Matrix darstellen, erscheinen in ihrer typisch flächigen und tubulusförmigen Konfiguration und können deutlich abgegrenzt werden (*Abbildung 21, Kontrolle*).



**Abbildung 20: Repräsentative Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) .**

Dargestellt ist ein Schnitt des *M. gastrocnemius* einer weiblichen Kontrollmaus. Erkennbar ist die regelmäßige Muskelstruktur und die gleichmäßige Anordnung intakter Mitochondrien. A= Mitochondrium, B= Bindegewebe, C= Muskelgewebe. Der Pfeil kennzeichnet die Myosinfilamente, die Pfeilspitze die Aktinfilamente des Muskelgewebes. Vergrößerung: 20000x.



**Abbildung 21: Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) von Kontroll- und ICS-Tieren im Vergleich.**

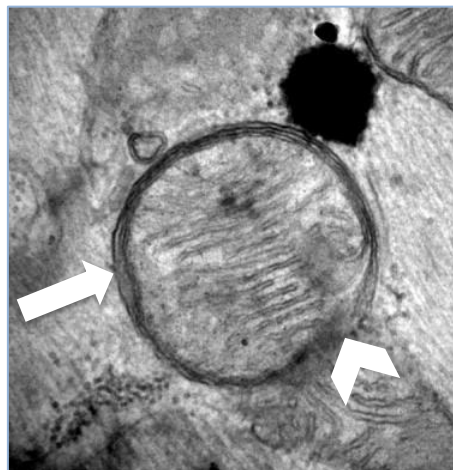
Dargestellt sind Schnitte des *M. gastrocnemius* und *M. soleus* männlicher und weiblicher Tiere. Man erkennt eine deutlich unregelmäßige Gewebestruktur und vermehrt geschädigte Mitochondrien in den Schnitten der ICS-Tiere. Vergrößerung :10000x (linke Spalte) und 20000x (rechte Spalte).

In direktem Vergleich können die elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Muskelgewebes von ICS-Mäusen gesetzt werden. In diesen Bildern erscheint das Muskelgewebe strukturell stark verändert. Zu erkennen sind eine unregelmäßige Anordnung



von Sarkomeren ebenso wie verzernte Z-Linien und Muskelfilamente. Die Mitochondrien im Muskelgewebe von ICS- Mäusen scheinen vergrößert und weisen zudem keine regelmäßige und aus der Kontrollgruppe typisch gewohnte Anordnung auf (*Abbildung 21, ICS*). Stattdessen liegen sie ungleichmäßig zwischen den Myofibrillen. Zudem scheint die Anzahl der Mitochondrien in dem durch Kältestressstrapaziertem Muskelgewebe erhöht zu sein. Dies wiederum kann mit der beobachteten erhöhten LDH-Aktivität in den ICS-Mäusen korrelieren (*Abbildung 10, Abbildung 11*). Zusätzlich lassen sich subsarkolemmale Anhäufungen von Glykogen beobachten. Interessanterweise scheinen die Mitochondrien außerdem strukturell beschädigt. Teile der äußeren Mitochondrienmembranen scheinen aufgelöst und innere Strukturen, wie beispielsweise die Cristae, sehen verzerrt und defekt aus (*Abbildung 21, ICS*).

In einigen Aufnahmen kann man ebenso Mitochondrien erkennen, die von membranösen Strukturen umgeben sind. *Abbildung 22* zeigt ein solches Mitochondrium, das von einer Doppelmembran umgeben zu sein scheint.



**Abbildung 22: Darstellung mitophagischer Abläufe.**

Das Mitochondrium scheint als charakteristisches Anzeichen für ablaufende Mitophagie von einer Doppelmembran umgeben zu sein (Pfeil). Die äußere Mitochondrienmembran erscheint beschädigt (Pfeilspitze). Vergrößerung: 80000x.

Dies ist ein spezifisches Merkmal und Charakteristikum für Autophagosomen und impliziert damit ablaufende Mitophagie in den Muskelzellen von ICS-Mäusen. Zudem weist das in *Abbildung 22* dargestellte Mitochondrium Schäden in seiner äußeren Membran auf, was dazu geführt haben könnte, dass die Zelle es als abzubauen erkennt und mittels Mitophagie recycelt.

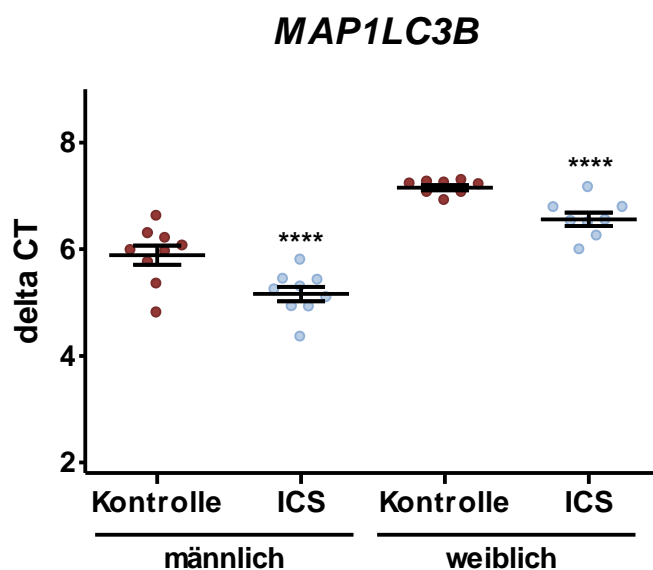
## 4.6. Analyse von Autophagie-spezifischen Markern in Gewebeproben von C57BL/6J Mäusen

Autophagie stellt einen für die Zellhomöostase unabdingbaren Vorgang dar, der in jedem Organismus und unter verschiedenen Umständen zellulären Stresses auftreten kann [98]. Aufgrund der vorliegenden elektronenmikroskopischen Ergebnisse, wurde im Folgenden die Expression von Autophagie-relevanten Molekülen im Muskelgewebe von Kontroll- und ICS-Tieren untersucht.

### 4.6.1. Expression von Map1lc3b und Becn1

Bei MAP1LC3B handelt es sich um ein Mikrotubulus-assoziiertes Protein, welches in der Formation von Autophagosomen eine wesentliche Rolle spielt [99]. Es fungiert dabei in einer Signalkaskade, die weiterhin durch zahlreiche verschiedene Atg-Proteine gesteuert wird, sowohl als Signalmolekül zur Komplettierung der Autophagosomenmembran als auch als Vermittler für die Auswahl von Degradationsmaterial [69]. Da die Synthese sowie Prozessierung von MAP1LC3B während stattfindender Autophagie gesteigert ist, können Expression und Gehalt dieses Proteins als zentraler Marker Auskunft über ablaufende Autophagie in einer Zelle liefern. Aus diesem Grunde wurde in dieser Arbeit aus Gewebeproben des linken *M. gastrocnemius* die Expression von *Map1lc3b* in C57BL/6J Mäusen bestimmt. Auch in diesem Fall sind in der folgenden Abbildung Delta CT-Werte dargestellt, deren Abnahme einer verstärkten Expression des Gens entspricht. Sowohl in den männlichen als auch in den weiblichen Versuchstieren der ICS-Gruppe ließ sich eine signifikant erhöhte Expression des Gentranskriptes von *Map1lc3b* feststellen. Dabei sanken die mittleren Delta CT-Werte der männlichen ICS-Mäuse von 5,89 auf 5,16 ( $p < 0,0001$ ) und die Expression stieg um das 1,6-fache. Die Delta CT- Werte der weiblichen ICS-Mäusen sanken von 7,16 auf 6,56 ( $p < 0,0001$ ), womit die Expression dieses Gens auf das 1,5-fache stieg (

Abbildung 23).

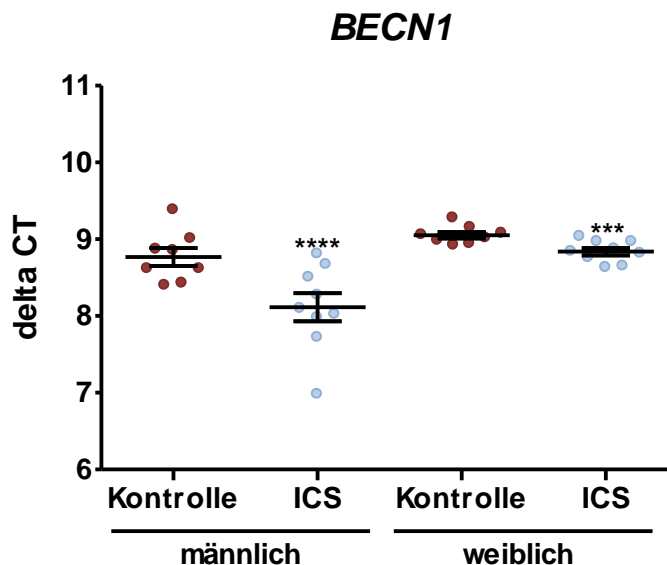


**Abbildung 23: Mittlere Expression von *Map1lc3b*.**

Mittels qRT-PCR erworbene Delta CT-Werte der mRNA-Expression. Jede einzelne Messung ist in Form eines Punktes dargestellt. Die Linien stellen die Mittelwerte der Delta CT-Werte  $\pm$  SEM dar. Verglichen wurden die mittleren Delta CT-Werte zwischen unbehandelten Kontrolltieren und ICS-Tieren.  $p$ -Werte  $<0,0001 = ****$ .

Ebenso wurde die Expression von *Becn1* in Gewebeproben des *M. gastrocnemius* bestimmt. BECN1 stellt ein regulatorisches Protein im Prozess der Autophagie dar. Es reguliert zum einen wichtige Proteinkinaseaktivitäten und spielt im Komplex mit anderen Molekülen sowohl bei der Initiierung der Autophagie als auch bei der Steuerung verschiedener Schritte dieses Prozesses eine entscheidende Rolle. In den Gewebeproben männlicher C57BL/6J Mäuse, die intermittierend dem Kältestress ausgesetzt wurden, zeigten sich Delta CT-Werte die von 8,77 auf 8,11 ( $p < 0,0001$ ) sanken und damit eine signifikant erhöhte Expression um das 2,3-fache bedingten. Bei den weiblichen ICS-Tieren sanken die mittleren Delta CT-Werte von 9,05 auf 8,84 ( $p = 0,002$ ) und zeigten ebenfalls eine signifikante Induktion des Transkriptes von *Becn1* um das 1,2-fache an (Abbildung 24).





**Abbildung 24: Mittlere Expression von *Becn1*.**

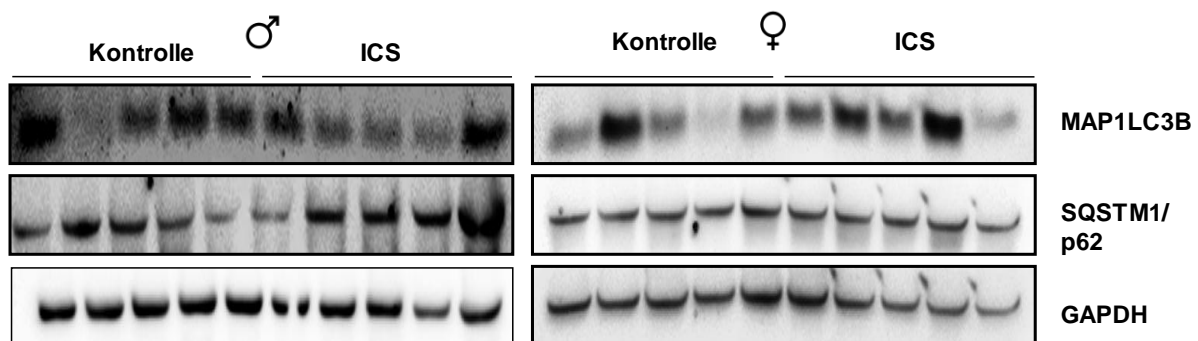
Mittels qRT-PCR erworbene Delta CT-Werte der mRNA-Expression. Jede einzelne Messung ist in Form eines Punktes dargestellt. Die Linien stellen die Mittelwerte der Delta CT-Werte  $\pm$  SEM dar. Verglichen wurden die mittleren Delta CT-Werte zwischen unbehandelten Kontrolltieren und ICS-Tieren. p-Werte  $<0,001$  = \*\*\* und p-Werte  $<0,0001$  = \*\*\*\*.

#### 4.6.2. Proteinverteilung von Map1lc3b und p62

p62 sorgt als multifunktionales Adaptormolekül für einen reibungslosen Ablauf der Selektion autophagischen Materials. Es besitzt zahlreiche Interaktionsdomänen, darunter auch eine für Map1lc3, die der Zulieferung von Proteinaggregaten zu den Lysosomen beziehungsweise Proteasomen dienen. Dabei befördert p62 hauptsächlich ubiquitinierte Proteine.

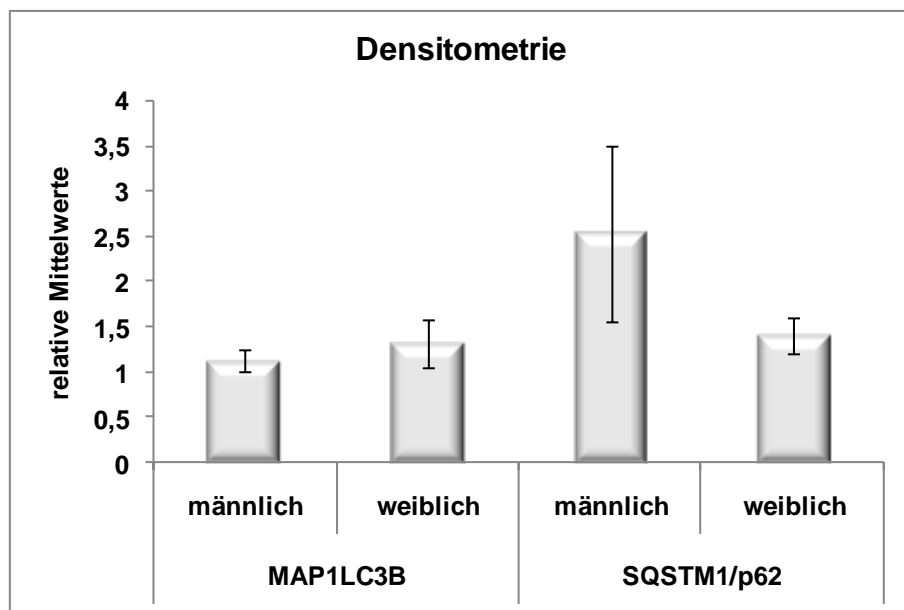
Aus Gesamtproteinen, die aus Proben des linken *M. biceps femoris* gewonnen wurden, wurden Western Blot- Analysen für die Proteine MAP1LC3B und p62 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in *Abbildung 25* und *Abbildung 26* dargestellt. Betrachtet man das alleinige Bandenmuster der beiden Proteine, wird für MAP1LC3B bei den männlichen ICS-Tieren eine gleichbleibende Proteinexpression deutlich. Bei den weiblichen ICS-Tieren lässt sich auf eine ebenso gleichbleibende bis leicht erhöhte Proteinexpression schließen. Für p62 zeigt sich bei den männlichen ICS-Mäusen eine erhöhte Expression, die weiblichen ICS-Tiere hingegen zeigen eine eher konstante Expression des p62- Proteins (*Abbildung 25*). Die densitometrischen Analysen gaben Aufschluss über eine konstante Expression des MAP1LC3B- Proteins sowohl in männlichen (1,12-fach) als auch in weiblichen (1,31-fach) ICS-Tieren. Die Expression des p62-Proteins in weiblichen ICS-Mäusen war ebenso konstant bis geringfügig erhöht (1,41-fach). Bei den männlichen ICS-Tieren zeigte sich die höchste Expression von p62 mit einer Induktion des Proteins um das 2,53-fache (*Abbildung*

26). Dabei waren keine signifikanten Ergebnisse festzustellen. GAPDH diente bei den Western Blots als Ladekontrolle.



**Abbildung 25: Western Blots für MAP1LC3B, SQSTM1/ p62 und GAPDH (Ladekontrolle).**

Proteinproben wurden aus Mitochondrien des linken *M. quadriceps femoris* von Kontroll- und ICS- Tieren gewonnen. Für MAP1LC3B lässt sich in den weiblichen ICS-Tieren eine leicht erhöhte Expression feststellen. p62 zeigt in den männlichen ICS-Tieren eine erhöhte Proteinexpression.



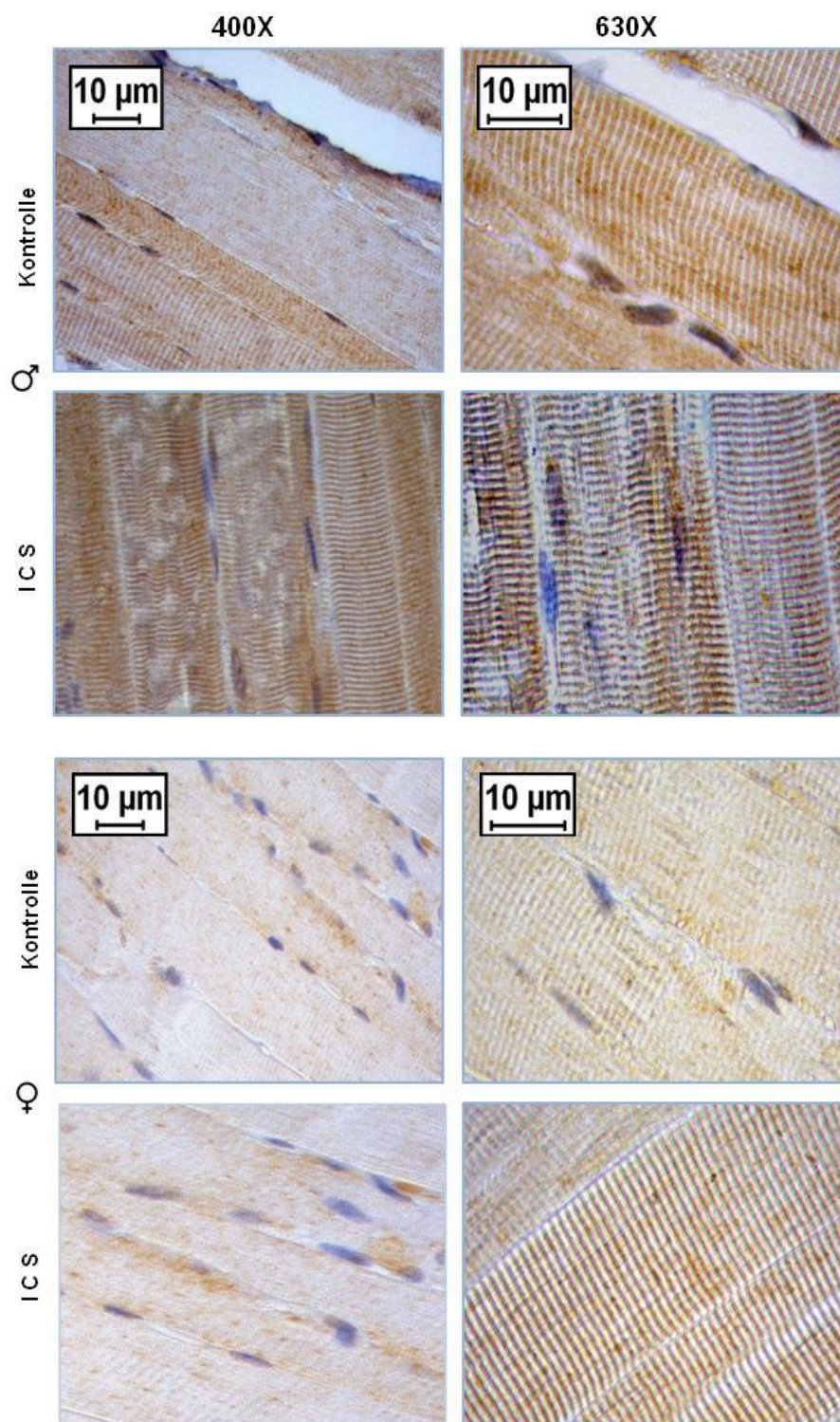
**Abbildung 26: Densitometrische Auswertung der Western Blots von MAP1LC3B und SQSTM1/p62.**

Dargestellt sind die relativen Mittelwerte der semiquantitativen Analyse, die im Verhältnis zur Expression des jeweiligen Referenzgens mit Hilfe der Software BIO-1D erfolgte. Die Kontrollen wurden auf den Wert „1“ gesetzt und die ICS-Tiere dazu in Relation gesetzt.

#### 4.7. Immunhistochemische Analyse der MAP1LC3B-Verteilung im Muskelgewebe von C57BL/6J Mäusen

Die Untersuchung spezifischer Autophagie-Marker sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene haben deutliche Anzeichen für den Ablauf autophagischer Prozesse geliefert. Auf Grund dessen, wurde in dieser Arbeit die Verteilung von MAP1LC3B, dessen Gehalt in Zellen als Goldstandard mit der Quantität autophagischer Prozesse korreliert [82] im Muskelgewebe von C57BL/6J Mäusen bestimmt.

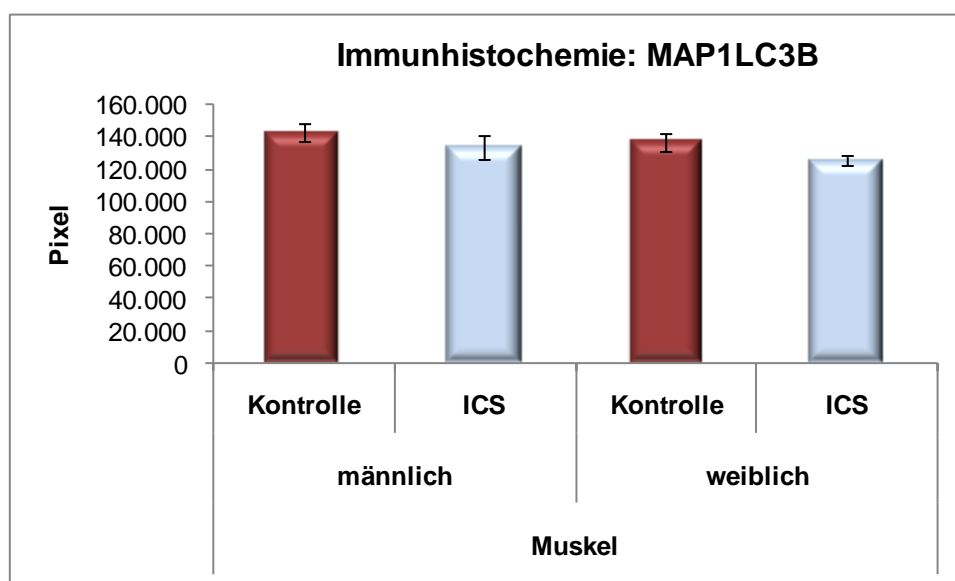
Histologische Präparate des linken *M. biceps femoris* wurden immunhistochemisch mittels MAP1LC3B-Antikörper gefärbt, um Unterschiede in der Verteilung und auch in Bezug der Menge dieses Proteins unter Beachtung des Einflusses intermittierenden Kältestresses auf die Muskulatur beurteilen zu können (*Abbildung 27*). Die MAP1LC3B-Verteilung in den Präparaten der Kontrolltieren schien großflächig und gleichmäßig. Es zeigten sich keine Akkumulationen oder Aggregate des Proteins. Allerdings konnte festgestellt werden, dass besonders Bereiche aus Bindegewebe sowie Blutgefäße als auch die Zellkerne der Muskelzellen eine deutlichere Färbung im Vergleich zum umliegenden Muskelgewebe zeigten. Diese Besonderheit konnte ebenso in den Präparaten der ICS-Tiere bemerkt werden. Allerdings wiesen die Präparate der ICS-Tiere, obwohl sie bezüglich der farblichen Intensität, die mit dem Proteingehalt von MAP1LC3B korreliert, keine Unterschiede zu den Kontrollpräparaten aufwiesen, dennoch eine deutlich andere Verteilung dieses Proteins auf. Bei den Mäusen, die dem intermittierenden Kältestress ausgesetzt wurden, konnte statt gleichmäßiger Verteilung eine „punktierte“ Färbung nachgewiesen werden. Es wurde eine große Zahl an „Aggregations-Spots“ detektiert. Diese Aggregationen von MAP1LC3B können auf die Formation von Autophagosomen zurückgeführt werden, die wiederum nur mit Hilfe der Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht werden können.



**Abbildung 27: Lichtmikroskopische Aufnahmen immunhistochemisch gefärbter Muskelpräparate männlicher und weiblicher C57BL/6J Mäuse.**

Präparate des linken *M. tibialis anterior* männlicher und weiblicher Kontroll- und ICS-Mäuse, dargestellt in 400-facher (linke Spalte) und 630-facher (rechte Spalte) Vergrößerung. Die Präparate wurden mittels MAP1LC3B-Antikörper nach Protokoll angefärbt (siehe Material und Methoden).

Die Auswertung der immunhistochemischen Präparate erfolgte mit Hilfe des Software-Programms *ImageJ* Version 1.48p. Pro Versuchsgruppe wurden immer vier Schnittpräparate in 400- sowie in 640-facher Vergrößerung betrachtet. Dabei wurden die RGB-Werte bestimmt und damit die Unterschiede in der Verteilung und im Gehalt des MAP1LC3B-Proteins festgestellt. Die Auswertung ergab keine deutlichen Unterschiede zwischen Kontroll- und ICS-Mäusen (*Abbildung 28*). Lediglich beide ICS-Gruppen zeigten eine sehr geringfügige Minderung in der Intensität der RGB-Werte, was allerdings auch auf die aggregierte Verteilung des MAP1LC3B-Proteins in diesen Mäusen zurückgeführt werden kann.



**Abbildung 28: Quantifizierung immunhistochemisch gefärbter Muskelpreparate.**

Beurteilung des Proteingehaltes in MAP1LC3B-gefärbten Schnittpräparaten des linken *M. tibialis anterior* männlicher und weiblicher Kontroll- und ICS-Mäuse. Die Präparate wurden in 400- und 630-facher Vergrößerung betrachtet. Mittels RGB-Wert-Bestimmung konnte der Proteingehalt beurteilt werden. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$ SEM.

## 5. Diskussion

Das FMS stellt ein komplexes Krankheitsbild unklarer Pathogenese dar, das sowohl Prozesse der Schmerzverarbeitung im zentralen und peripheren Nervensystem als auch im endokrinen System sowie der Muskulatur beinhaltet.

Die vorliegende Arbeit zeigt neue Erkenntnisse in der Forschung am FMS: Effekte intermittierenden Kältestresses auf den Stoffwechsel und auf molekularbiologische Eigenschaften von C57BL/6J Mäuse sowie Effekte auf morphologischen Strukturen der behandelten Mäuse.

Es konnte festgestellt werden, dass das Gentranskript von *Coq10b* in weiblichen ICS-Mäusen hochreguliert wurde, wohingegen densitometrisch eine Minderung von COQ10B auf Proteinebene festzustellen war. Die Quantifizierung von *Cox4i1* zeigte auf mRNA-Ebene eine Hochregulierung in männlichen ICS-Mäusen und auf Proteinebene neben starken Unregelmäßigkeiten auch eine Minderung der Expression in männlichen und weiblichen ICS-Tieren. Die LDH-Aktivität in mitochondrialen Extrakten war in männlichen ICS-Versuchstieren signifikant erhöht. Variationen im Glykogengehalt konnten histologisch im Muskel- und Lebergewebe männlicher ICS-Mäuse festgestellt werden. Elektronenmikroskopische Analysen wiesen Formationen autophagischer Vesikel auf und lieferten zudem einen deutlichen Hinweis auf mitochondriale Degradation. In diesem Zusammenhang war die Expression von *Map1Lc3b* und *Becn1* als Autophagie-spezifische Gene in ICS-Mäusen deutlich erhöht. Auf Proteinebene zeigte MAP1LC3B eine konstante Distribution in beiden Versuchsgruppen, allerdings eine aggregierte Distribution des Proteins in ICS-Mäusen. p62 als wichtiges Adaptermolekül autophagischer Prozesse zeigte in ICS-Mäusen, vor allem in den männlichen, eine erhöhte Proteinexpression.

### 5.1. Zu den Methoden der Arbeit

#### *Das ICS-Mausmodell*

Die Interaktion der verschiedenen Systeme, die an der Pathogenese des FMS beteiligt zu sein scheinen, kann *in vitro* oder an isolierten Organen nicht simuliert werden, sodass die Untersuchung im Tiermodell unumgänglich ist.

Für die Induktion einer fibromyalgie-ähnlichen Schmerzsymptomatik wurden C57BL/6J Mäuse nach dem Prinzip des ICS-Modells behandelt. In diesem von Nishiyori *et al.* [100] beschriebenen Modell wird durch festgelegte Kältetemperaturen, die alternierend im Wechsel mit Raumtemperaturen eingesetzt werden, eine Schmerzsymptomatik in Mäusen induziert, die in grundlegenden Faktoren mit der Schmerzsymptomatik des FMS übereinstimmt. Dazu gehört eine der Fibromyalgie entsprechende lang anhaltende Hyperalgesie und Allodynie [100]. Zudem ist in diesem Modell die Schmerzsymptomatik



durch die Gabe von Antidepressiva als auch Gabapentin reversibel, wohingegen Morphine keinerlei Besserung der Symptomatik aufweisen[92]. In Analogie zur klinischen Situation beim Menschen weist dieses übereinstimmende Phänomen auf eine potentiell ähnliche Pathophysiologie der Schmerzsymptomatik hin. Somit zeigt das ICS-Modell einen klaren Vorteil gegenüber anderen Modellen, die im Hinblick auf die Symptomatik und im Vergleich mit der humanen Präsentation des FMS größere Diskrepanzen aufweisen [101]. In dieser Arbeit wurden insgesamt 36 C57BL/6J Mäuse eingesetzt, von denen 18 Tiere als Kontrollgruppe dienten und die restlichen 18 Mäuse als Versuchsgruppe dem intermittierenden Kältestress ausgesetzt wurden. In dem Modell des intermittierenden Kältestresses wurde von Nishiyori und Kollegen die durch die alternierenden Kältetemperaturen erzielten Effekte hinsichtlich der Schmerzresonanz und –Verarbeitung zusätzlich durch spezielle Nozizeptions-Verfahren überprüft. Dabei wurden unter anderem unter Einsatz des digitalen von Frey Apparate den Pfoten-druck-Test sowie auch thermische Stimuli durchgeführt, um das Pfoten-Rückzugsverhalten der Mäuse zu beobachten. Unter Begutachtung dieser Parameter konnten sie Rückschlüsse auf die durch den Kältestress veränderte Schmerzantwort der Mäuse ziehen. Es muss angemerkt werden, dass in dieser Arbeit keine zusätzliche Prüfung des Schmerzverhaltes durch oben erwähnte Nozizeptions-Verfahren stattgefunden hat. Es wurde sich lediglich bei allen Versuchsschritten strikt an das Protokoll von Nishiyori *et al.* gehalten und somit wird davon ausgegangen, dass die Mäuse auch in Bezug auf die Schmerzantwort identische Veränderungen aufzeigen.

#### *Blutgasanalyse, Mitochondrienisolation, Histologische Untersuchungen und LDH-Aktivität*

Um Veränderungen in den Blutgasen und Blutparametern zu identifizieren, wurde im Vorhinein eine CO<sub>2</sub> -Narkose ausgeschlossen, um Verfälschungen der Werte zu vermeiden. Daher wurden die Versuchstiere mittels Genickbruch getötet und Blutproben aus dem retroorbitalen Venenplexus entnommen, die direkt mittels BGA-Gerät analysiert wurden. Schrittweise erfolgte die Präparation von Muskulatur sowie Lebergewebe, welches im Anschluss verschiedenen Analysen diente. Aus dem Muskelgewebe wurden zum einen strikt nach dem Protokoll von Gostimskaya *et al.* Mitochondrien isoliert [93]. Aus dem isolierten Mitochondrienextrakt wurde zunächst die Laktatdehydrogensase-Aktivität bestimmt. Die Aktivität dieses Enzyms ist der Goldstandard in der Beurteilung von Zellstress und liefert gleichzeitig Informationen über den Energiestoffwechsel der Zellen [102]. Hierbei muss betont werden, dass die gemessenen Werte und Angaben ausschließlich Auskünfte über die Laktatdehydrogensase-Aktivität in den Mitochondrien der Versuchstiere liefern und keine Rückschlüsse über die Konstitution dieses Enzyms innerhalb der anderen Gewebe der Versuchstiere ziehen lässt. Um die Muskelmorphologie besonders hinsichtlich der

Sarkomerkonstitution zu beurteilen, wurden HE-gefärbte Schnittpräparate analysiert und Sarkomerlängen ausgemessen. Hierbei wurde in den Schnittpräparaten immer Sarkomerlängen von 10 verschiedenen Blickfeldern ausgemessen. Die Beurteilung von Variationen in der Glykogenverteilung wurde anhand von PAS-gefärbten Schnittpräparaten von Muskel- und Lebergewebe unternommen. Dabei muss auch hier angemerkt werden, dass für die Bewertung das Programm *ImageJ* verwendet wurde und jeweils 3 unterschiedliche Blickfelder in den jeweiligen Schnitten analysiert wurden.

#### *Validierung mitochondrialer und autophagischer Marker*

Insgesamt bauten die durchgeführten Versuche aufeinander auf und dienten dazu einander zu bestätigen und spezifizieren. Somit wurde aus den mitochondrialen Extrakten zusätzlich eine Quantifizierung von COQ10B-Protein durchgeführt. Dabei wurde COX4I1 als Ladekontrolle verwendet, welches in der Literatur als geeignetes Protein für solche gilt [103, 104]. Um den Effekt des ICS auf die ausgewählten Zielgene *Coq10b* und *Cox4i1* zu untersuchen, wurde zusätzlich eine qRT-PCR der mRNA dieser Zielgene durchgeführt. Elektronenmikroskopische Erkenntnisse im Hinblick auf autophagische Geschehen im Gewebe der behandelten Mäuse wurden durch Quantifizierungen von Autophagiespezifischen Genen und Proteinen verifiziert. Es wurde mittels qRT-PCR die Genexpression von *Map1lc3b* und *Becn1* bestimmt und über Western Blot-Analysen die Proteinexpression von MAP1LC3B und p62 validiert. Besonders die Ergebnisse der qRT-PCR der mRNA sind hierbei kritisch zu bewerten. Es konnte in zahlreichen Untersuchungen gezeigt werden, dass die Expression der mRNA nicht zwangsläufig mit der Proteinexpression korreliert [105]. Um allerdings den natürlichen Unterschieden in der Expression der Gene sowohl in der Kontroll- als auch in der ICS-Gruppe gerecht zu werden, wurden für die qRT-PCR-Analysen Delta CT-Werte in den Abbildungen dargestellt. Ebenso wurde durch Immunhistochemie die Lokalisation von MAP1LC3B-Protein im Muskelgewebe der ICS-behandelten Mäuse bestimmt, um Rückschlüsse auf eine veränderte Verteilung dieses Proteins zu ziehen.

Insgesamt dienten die Ergebnisse aller Untersuchungen der Beurteilung und Veranschaulichung erzielter Effekte von intermittierendem Kältestress auf den Stoffwechsel und die Muskelmorphologie von C57BL/6J Mäusen, um anhand dessen Schlussfolgerungen über mögliche Pathomechanismen des FMS ziehen zu können. Allerdings muss an dieser Stelle eingeräumt werden, dass generell sowie auch in diesem Fall, trotz anerkannter Etablierung des ICS-Modells, Studien an Mäusen nicht vorbehaltlos auf den Menschen übertragbar sind, da es gewisse Unterschiede zwischen den Spezies gibt. Zudem ist auch noch nicht endgültig geklärt, ob der Einfluss intermittierenden Kältestresses, der zwar



hinsichtlich der resultierenden Schmerzsymptomatik verblüffende Gemeinsamkeiten zur humanen Präsentation des FMS liefert, auch in anderen Aspekten auf diese schließen lässt.

## 5.2. Veränderungen metabolischer Parameter durch intermittierenden

### Kältestress

Die Auswirkungen intermittierenden Kältestresses wurden bisher nur in Bezug auf das Schmerzverhalten und die Schmerzsymptomatik in C57BL/6J Mäusen untersucht. Studien zu Konsequenzen oder Effekten auf molekularer und metabolischer Ebene, wie zum Beispiel Veränderungen im Muskelgewebe oder Alterationen im mitochondrialen Stoffwechsel stehen bisher noch aus und sind aktuell Thema dieser Dissertation.

Gegenwärtige Literatur gibt Hinweise auf biochemische Abnormitäten und vernehmbare Veränderungen im Glukose-Stoffwechsel von Fibromyalgie-Patienten [94]. Somit konnte Eisinger *et al.* nachweisen, dass Blutproben von Patienten, die von einem FMS betroffen sind, erhöhte Pyruvat-Werte und erniedrigte Laktat-Werte aufweisen. Zudem konnte eine Minderung von sowohl Adenosintriphosphat als auch von Isoenzymen der LDH im Plasma und Serum nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang wurde in dieser Arbeit die LDH-Aktivität in mitochondrialen Extrakten, die aus peripherem Skelettmuskel isoliert wurden, bestimmt. Unsere Versuche zeigten, dass die LDH-Aktivität sowohl in den männlichen als auch den weiblichen ICS-Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht war. Dabei wiesen die männlichen ICS-Mäuse eine signifikante Erhöhung auf. Das Enzym LDH nimmt im Energiestoffwechsel eine wesentliche Rolle ein, da es an der Katalysation von Laktat zu Pyruvat und umgekehrt beteiligt ist. Ebenso ist das Mitwirken der LDH für die Bereitstellung von NADH notwendig, welches als Energieäquivalent und Coenzym für zahlreiche zelluläre Stoffwechselwege unabdingbar ist [106].

Zusätzlich konnte in zahlreichen Studien eine Veränderung im Glykogenverteilungsmuster beobachtet werden. Damit konnte in elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Muskelbiopsien, die von Fibromyalgie-Patienten stammten, sowohl eine Deposition als auch eine Akkumulation von Glykogen festgestellt werden [55, 56, 107], die beide elektronenmikroskopisch auch in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden konnten. Zusätzlich wurden in der vorliegenden Studie der Glykogengehalt in histologischen Muskel- und Leberpräparaten von ICS- und Kontrollmäusen bestimmt. Sowohl im Muskel- als auch im Lebergewebe der männlichen ICS-Mäuse konnte eine Erniedrigung des Glykogengehaltes festgestellt werden. Dabei war im Lebergewebe der männlichen ICS-Mäuse die Reduktion des Glykogengehaltes signifikant. Die weiblichen ICS-Mäuse hingegen zeigten sowohl im Muskel- als auch im Lebergewebe im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine unveränderte Glykogenverteilung. In diesem Zusammenhang, zeigte sich auch in der

BGA der männlichen ICS-Tiere ein erniedrigter Glucose-Wert. Diese beschriebenen metabolischen Daten, können mit den anderen zentralen Ergebnissen dieser Arbeit wie dem elektronenmikroskopischen Nachweis mitochondrialer Degradation und der Schädigung von Muskelgewebe durch intermittierenden Kältestress in Verbindung gesetzt werden und sollen im Folgenden diskutiert werden.

Innerhalb der Mitochondrien laufen viele wichtige und energieliefernde Prozesse ab. Durch die Schädigung dieser Organellen kann damit der Ablauf dieser essentiellen Stoffwechselwege der Zelle verhindert sein. Zu den wichtigsten energieproduzierenden Prozessen der Zelle zählt der Citratzyklus. Der Citratzyklus der auch als Tricarbonsäurezyklus bezeichnet wird und bei Eukaryoten in der Matrix der Mitochondrien abläuft, stellt eine Abfolge biochemischer Reaktionen dar, die wesentlich dem oxidativen Abbau organischer Substanzen und damit zum Zweck der Energiegewinnung dienen. Zudem werden über den Citratzyklus auch wichtige Zwischenprodukte für verschiedene biosynthetische Abläufe der Zelle bereitgestellt. Einer der wichtigsten Zwischenprodukte, welches beim Abbau von Fetten, Aminosäuren und Zuckern entsteht, ist Acetyl-CoA. Acetyl-CoA stellt die aktivierte Form von Coenzym A dar und ist eine energiereiche Thioesterverbindung. Es entsteht hauptsächlich durch zwei verschiedene Stoffwechselvorgänge. Zum einen wird es im Rahmen des Fettsäureabbaus durch die  $\beta$ -Oxidation gebildet, die ebenso in der Matrix der Mitochondrien abläuft. Eine weitere Quelle stellt der Abbau von Aminosäuren und die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat dar, welches als Endprodukt der Glykolyse entsteht [106].

Acetyl-CoA seinerseits kann im Mitochondrium zwei Wege einschlagen und entweder durch den bereits oben erwähnten Citratzyklus und durch die Atmungskette komplett zu Kohlenstoffdioxid und Wasser abgebaut werden. Dabei kann dann direkt oder indirekt Energie zur Verfügung gestellt werden. Oder aber Acetyl-CoA kann zur Synthese von wertvollen Zwischenprodukten wie zum Beispiel Triglyceriden oder Cholesterin für die Formation organischer Körperbestandteile herangezogen werden und spielt damit eine erhebliche Rolle für anabole Prozesse der Zelle. Es ist denkbar, dass in erster Linie durch die bewiesene Schädigung der Mitochondrien, der in diesen Organellen ablaufende Citratzyklus nicht mehr uneingeschränkt stattfinden kann und die Zelle damit gezwungenermaßen auf eine anaerobe Energiegewinnung umstellen muss. Damit kann die bereits oben erwähnte oxidative Decarboxylierung von Pyruvat auch nicht mehr stattfinden, sodass die Zelle auf einen Ausweichmechanismus und eine Alternative umsteigen muss, um das überschüssige Pyruvat zu verwerten [106].

An dieser Stelle lassen sich die nachgewiesenen erhöhten LDH-Werte der durch Kältestress behandelten Tiere erklären. Das Enzym ist in der Lage das vermehrt angefallene Pyruvat, welches durch den mitochondrialen Schaden keiner oxidativen Verwertung mehr zugeführt

werden kann, nun in das strukturverwandte Lactat umzuwandeln. Lactat wiederum kann nun innerhalb des Cori-Zyklus verwertet werden. Dabei stellt der Cori-Zyklus eine Verknüpfung zwischen dem Glukosestoffwechsel und Skelettmuskulatur und Leber dar. Skelettmuskulatur ist grundsätzlich und damit auch unter aeroben Bedingungen nicht in der Lage Glukoneogenese zu betreiben und damit Glukose herzustellen. Bei muskulärer Betätigung entstehen schnell anaerobe Bedingungen in der Muskulatur. Die benötigte Energie wird in diesem Fall hauptsächlich durch die Glykolyse erzeugt. Diese anaeroben Verhältnisse beeinträchtigen in gewisser Weise die Funktion der Mitochondrien und damit die Energiegewinnung über die Atmungskette, sodass es zu einem Überschuss an Pyruvat kommt, welches nicht mehr über den Citratzyklus abgebaut werden kann. Das Pyruvat wird dann wie bereits oben beschrieben durch die LDH in Lactat umgewandelt. Das gebildete Lactat gelangt wiederum über den Blutkreislauf in die Leber, wo es über die Gluconeogenese in Glucose umgewandelt wird. Die neu gebildete Glucose kann dann entweder in der Leber als Energiespeicher in Form von Glykogen deponiert werden oder aber bei Bedarf über den Blutkreislauf in die Muskulatur transportiert werden.

Unter der Annahme, dass über das ICS-Modell ein muskulärer Schaden und damit Zellstress entsteht, da keine aerobe Energiegewinnung mehr stattfinden kann, lassen sich neben der erhöhten LDH-Aktivität auch die zur Glykogenverteilung beschriebenen Ergebnisse erklären. Diese zeigten, dass es zu einer Minderung des Glykogens im Muskel- und Lebergewebe männlicher ICS-Mäuse kommt. Die Zelle muss gewissermaßen mit den ihr verbliebenden Möglichkeiten Energie bereitstellen. Dabei liefert die erwähnte vermehrte Umwandlung von Pyruvat in Lactat einerseits im Skelettmuskel das für die Glykolyse vorhandener Glykogenspeicher notwendige Coenzym NADH. Andererseits kann Lactat wie bereits beschrieben über den Cori-Zyklus verwertet werden und der Energieproduktion dienen. Damit akquiriert die Zelle zwei Wege der Energieerzeugung, die beide zu einer Reduktion des gespeicherten Glykogengehaltes führen können. Die in den weiblichen ICS-Tieren hingegen gleichbleibende Glykogenverteilung könnte sich durch hormonelle Unterschiede zwischen beiden Geschlechtern erklären lassen. In dieser Hinsicht könnte vor allem Progesteron eine erhebliche Rolle spielen, da es in erster Linie auch für die generelle Regression des Stoffwechsels bekannt ist [108].

### 5.3. Variabilität in der Expression spezifischer Enzyme durch mitochondriale Degradationsvorgänge

Oxidativer Stress im Zusammenhang mit mitochondrialer Degradation wurden bereits als entscheidende Faktoren in der Pathogenese des FMS beschrieben [109, 110]. Unter oxidativem Stress versteht man eine Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen ROS, die als freie Radikale wirken, und den antioxidativ wirksamen Enzymen einer Zelle zu Gunsten der freien Radikalen. ROS entstehen hauptsächlich während Störungen in den Elektronentransportvorgängen innerhalb der mitochondrialen Atmungskette und umfassen das Superoxid-Anionenradikal  $O_2^-$ , Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und das Hydroxylradikal  $OH^\cdot$ . Diese freien Radikale können zu einer Schädigung der mitochondrialen DNA aber auch zu einer generellen Beeinträchtigung der Mitochondrien führen. Daneben sind weitere Folgen des oxidativen Stresses die Lipidperoxidation und die Proteinoxidation. Es gibt verschiedene Schutzmechanismen, denen sich Zellen und Gewebe bedienen können um sich vor den Konsequenzen des oxidativen Stresses zu schützen. Dazu gehören enzymatische und nichtenzymatische Radikalfänger und Antioxidantien sowie Reparaturmechanismen der DNA und der kontrollierte und gesteuerte Protein- und Organellenabbau.

Einige Arbeitsgruppen haben sich nachhaltig mit der Bedeutung des Kontextes von oxidativen Stress beziehungsweise mitochondrialer Degradation und des FMS beschäftigt. Dabei lag das Augenmerk hauptsächlich auf der Untersuchung von Parametern, die Folgen oxidativen Stresses darstellen und inwiefern diese entweder mitochondriale Funktionen beeinträchtigen oder aber gar einen Zellschaden verursachen.

Meeus *et al.* haben sich mit der Rolle der mitochondrialen Dysfunktion aufgrund oxidativen Stresses beim FMS beschäftigt. Sie konnten erhöhte ROS-Werte und eine dadurch bedingte Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion feststellen. Diese äußerte sich unter anderem in erniedrigten ATP-Messwerten, die wiederum eine Verbindung zu den chronischen Schmerzen beim FMS darstellen [111]. La Rubia *et al.* haben sich insbesondere mit den oxidativen und antioxidativen Parametern im Serum von Fibromyalgie-Patienten auseinandergesetzt. Dabei wurden 45 Patienten und 25 Kontrollpersonen zum einen auf Lipid- und Proteinperoxidation und oxidative DNA- Schäden untersucht und zum anderen wurden die totale antioxidative Kapazität und antioxidative Enzymkapazitäten bestimmt. Bei Patienten mit FMS wurde ein deutliches Ungleichgewicht zwischen oxidativen (Lipid- und Proteindeposition, oxidative DNA-Schäden) und antioxidativen (Enzymkapazitäten der Superoxiddismutase oder Glutathionperoxidase) Parametern gefunden [112]. Eine weitere Studie zeigte eine verminderte antioxidative Kapazität sowohl im Serum als auch in der Muskulatur von Patienten mit Fibromyalgie und gleichzeitig eine Korrelation mit der klinischen Symptomatik [66]. Bagis *et al.* haben sich ebenso mit der Fragestellung auseinandergesetzt, wie das FMS mit dem Vorliegen von oxidativem Stress

zusammenhängt. Bei einer größeren Stichprobe von 85 weiblichen Fibromyalgie-Patienten und einer Kontrollgruppe von 80 Personen, konnten auch hier vermehrt freie Radikale und erniedrigte antioxidative Enzymkapazitäten im Serum von Fibromyalgie-Patienten festgestellt werden [109]. In einer weiteren Studie haben Cordero *et al.* in mononukleären Blutzellen von Fibromyalgie-Patienten reduzierte COQ10-Werte, ein reduziertes mitochondriales Membranpotenzial und erhöhte Werte von mitochondrialen Superoxiden festgestellt. Eine erhöhte Lipidperoxidation ließ sich sowohl in den Blutzellen als auch im Plasma der Patienten zeigen. Ebenso wurde von Castro-Marrero *et al.* herausgefunden, dass eine erhöhte Lipidperoxidation, ein erniedrigter mitochondrialer DNA-Gehalt und eine reduzierte Aktivität der Citrat-Synthase vorliegen. Im Allgemeinen korreliert die Aktivität der Citrat-Synthase mit der mitochondrialen Masse [113]. Zusätzlich wurde auch herausgefunden, dass in mononukleären Blutzellen von Patienten mit FMS erniedrigte COQ10-Werte und ATP-Konzentrationen vorliegen [114].

In dieser Arbeit wurden keine oxidativen oder antioxidativen Parameter bestimmt. Es konnte aber eine mitochondriale Degradation über die elektronenmikroskopischen Analysen der Mausmuskulatur erschlossen werden. Zusätzlich wurden spezifische Marker bestimmt, die einen deutlichen Hinweis auf ablaufende Autophagie beziehungsweise Mitophagie im Muskelgewebe der ICS-Mäuse lieferte. Um die Auswirkungen des intermittierenden Kältestresses auf die mitochondriale Funktion beurteilen zu können, wurde in dieser Arbeit die Expression von COQ10B und COX4I1 analysiert. COQ10 ist für den oxidativen Metabolismus im Rahmen der Atmungskette der Mitochondrien unabdingbar und fungiert als Elektronenüberträger zwischen den verschiedenen Komplexen [115]. Daher kann die Expression von COQ10 auch dazu dienen, die mitochondriale Funktion zu beurteilen [96]. Neben der bereits genannten Literatur, die neben den erhöhten oxidativen Stressparameter auch erniedrigte COQ10-Werte bei Patienten mit FMS beschrieb, gibt es auch Hinweise, dass der Mangel oder ein Defizit von COQ10 sowohl zu einer erhöhten Produktion von ROS führen kann als auch zu einer Reduktion der Atmungskettenfunktion [116]. Dies wiederum bedingt mitochondriale Schäden und Veränderungen des mitochondrialen Membranpotenzials was letzten Endes zur Mitophagie führen kann [91,116]. Die gegenwärtige Arbeit zeigt in Analogie zur benannten Literatur bei Betrachtung der Bandenintensität eine Reduktion von COQ10B auf Proteinebene in den männlichen ICS-Mäusen. Mit Hilfe der densitometrischen Auswertung lässt sich ebenso eine Reduktion bei den männlichen ICS-Mäusen beobachten, der Effekt bei den weiblichen ICS-Mäusen hingegen fällt, wie auch schon bei Betrachtung der Bandenstärken, gering aus. Diese offensichtliche Reduktion des COQ10B-Gehaltes auf Proteinebene lässt auch in dem Mausmodell einen mitochondrialen Degradationsprozess als plausibel erscheinen. Im Gegensatz dazu, lässt sich auf Transkriptionsebene bei den weiblichen ICS –Tieren eine

Erhöhung der Expression von *Coq10b* feststellen. Allerdings erscheint auch dieses Ergebnis im Zusammenhang betrachtet evident. Die Tatsache, dass COQ10B auf Proteinebene bei den durch Kältestress behandelten Mäusen eine Minderung aufwies, spricht gemeinsam mit der gleichzeitig erhöhten Genexpression für einen erhöhten Verbrauch dieses Moleküls und lässt sich folglich mit den Ergebnissen von Cordero *et al.* vereinbaren. Die erhöhte Genexpression lässt sich damit über eine Gegenregulation der Zelle im Sinne einer Kompensation erklären, da diese bei vorhandenen erniedrigten COQ10B –Werten, die sich durch mitochondriale Schäden erklären lassen, versucht einen Ausgleich zu schaffen und den Schaden über eine erhöhte Expression dieses Moleküls zu begleichen.

Desweiteren wurde die Expression von COX4I1 bestimmt, welches ebenso für den reibungslosen Ablauf der Atmungskette unentbehrlich ist [117]. Die Untersuchung auf Transkriptionsebene ergab bei den männlichen ICS-Tieren eine Erniedrigung der *Cox4i1*-Expression, bei den weiblichen ICS-Tieren hingegen konnten keine deutlichen Veränderungen vernommen werden. Auf Proteinebene lässt sich durch densitometrische Auswertungen sowohl bei den männlichen als auch bei den weiblichen ICS-Tieren eine deutliche Reduktion des COX4I1-Gehaltes feststellen. Bei der alleinigen Betrachtung des Bandenmusters jedoch ist nur ein geringer Unterschied zwischen ICS- und Kontrollgruppe zu vernehmen. COX4I1 gilt in der Literatur als geeignete Ladekontrolle für mitochondriale Proteinextrakte.

Die Tatsache jedoch, dass die Expression dieses Moleküls, trotz Beladung der Geltaschen mit gleichen Proteinmengen, nicht homogen war, ermöglichte keine Verwendung als Ladekontrolle. Dies weist darauf hin, dass folglich genau wie die Expression von COQ10 auch die COX4I1-Expression von der bereits nachgewiesenen mitochondrialen Degradation betroffen ist.

Die vorliegenden Studien samt der präsentierten Literatursprechen dafür, dass oxidativer Stress eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie des FMS spielt. Allerdings wurde noch nicht einheitlich geklärt, ob die Abnormitäten die durch den oxidativen Stress verursacht werden nun die Folge oder die Ursache des FMS darstellen. Dargelegt werden kann nur, dass es sich um einen verstärkende Mechanismus handelt, da die Entstehung von ROS zu Schäden führt, die wiederum zu einer erhöhten ROS-Produktion und damit zu weiteren Schäden führen. In Anbetracht der Ergebnisse dieser Arbeit, lässt sich auch feststellen, dass ein Mangel an COQ10, ein Ungleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Parametern und letztendlich die dadurch bedingte mitochondriale Degradation bei der Pathogenese und der Symptomatik des FMS eine bedeutende Rolle spielen. Zusätzliche Untersuchungen und vor allem auch die Beurteilung und das Verhalten von oxidativen und antioxidativen Variablen unter dem Einfluss intermittierenden Kältestresses wären empfehlenswert, um weitere Rückschlüsse auf die Kausalbeziehung schließen zu

können sowie um weitere Gemeinsamkeiten zwischen ICS-Modell und humaner Präsentation des FMS zu erkennen und dadurch hinsichtlich Therapieoptionen oder Interventionen neue Möglichkeiten zu eröffnen.

#### 5.4. Beurteilung morphologischer Veränderungen in der Skelettmuskulatur

In verschiedenen Studien und Arbeiten konnten bereits Störungen und Veränderungen der Muskelstruktur bei Betroffenen mit FMS gefunden werden [118]. Lichtmikroskopische Analysen wurden dabei eher kontrovers diskutiert, da sie hinsichtlich Läsionen und strukturellen Veränderungen nur geringfügige und teilweise unspezifische Unterschiede aufwiesen. Somit wurde von einigen Autoren ein typisches mottenfraß-ähnliches Muster der Myofibrillen in Muskelbiopsien von Patienten mit FMS beschrieben, was sich allerdings als unspezifisch herausstellte, da diese Veränderung ebenso in der Kontrollgruppe zu beobachten war [56, 119, 120]. In anderen Studien konnten beschädigte rote Muskelfasern in Biopsien des *M. trapezius* und *M. deltoideus* von Fibromyalgie-Betroffenen festgestellt werden. Dies könnte auch eine eventuell mögliche Ähnlichkeit des FMS zu mitochondrialen Myopathien sein, da auch in diesem Fall Läsionen von roten Muskelfasern typisch sind [120]. Die Arbeit von Sprott *et al.* schaffte weitere Erkenntnisse und Einblicke in die Debatte der muskulären Störung beim FMS vor allem durch elektronenmikroskopische Analysen. So wurden in Biopsien des *M. deltoideus* Abnormitäten bei Patienten mit FMS wahrgenommen. Dabei wurden Biopsien von jeweils zehn Fibromyalgie-Patienten und zehn gesunden Probanden desselben Geschlechts und Alters verblindet untersucht. Bei den gefundenen Abnormitäten handelte es sich unter anderem um eine erhöhte DNA-Fragmentierung in den Nuklei des Muskelgewebes von Fibromyalgie betroffenen Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Muskuläre Läsionen wurden in der Arbeit von Sprott *et al.* sehr eindrücklich beschrieben und dargestellt. Zum einen zeigten sich eine Desorganisation der Muskelfibrillen und Aktin-Filamente mit verzerrten Z-Linien sowie eine Reduktion der Anzahl an Mitochondrien und eine veränderte Struktur dieser Organellen. Zudem konnte auch ein erhöhter Gehalt an Glykogen und Lipidablagerungen festgestellt werden [55]. Auch Kalyan-Ramas *et al.* [119] und Yunus *et al.* [56] konnten in Biopsien des *M. trapezius* in 10 von 12 erkrankten Patienten Veränderungen bezüglich Form, Volumen, Orientierung und Verteilung von Mitochondrien zeigen. Ebenso konnte bei 2 von 12 Patienten eine Unregelmäßigkeit der Z-Linien nachgewiesen werden. Allerdings muss angemerkt werden, dass beiden Arbeiten eine fundierte bildgebende Untermalung fehlte und ebenso eine Kontrollgruppe nicht vorhanden war. Yunus *et al.* hat daraufhin zwei Jahre später erneut eine Studie veröffentlicht, in der nun Proben des *M. trapezius* von 21 Patienten mit FMS und elf Kontrollpatienten untersucht

wurden [121] und keine deutlichen Unterschiede zwischen beiden Gruppen festgestellt wurden, allerdings konnten elektronenmikroskopisch relevante Unterschiede nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit wurden lichtmikroskopisch Präparate des *M. tibialis anterior* untersucht und es konnten ebenso keine spezifischen muskulären Veränderungen in den ICS-Mäusen erkannt werden. Die Ausmessung der Sarkomere zeigte auch keinerlei Unterschiede in der Länge dieser Strukturen. Lediglich Schrumpfungsartefakte aufgrund der Anfertigung der histologischen Präparate waren zu vernehmen, dies jedoch gleichermaßen in allen Präparaten.

Im Gegensatz dazu, wiesen die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der *Mm. gastrocnemii* und *soleii* der ICS-Mäuse auch in der vorliegenden Arbeit sehr eindrückliche Ergebnisse auf. Hier konnte ebenfalls eine beschädigte Muskelstruktur mit Desorganisation der Aktin- und Myosinfilamente und damit einhergehenden irregulären Sarkomeren und verzerrten Z-Linien nachgewiesen werden. Eine erhöhte Anzahl strukturell beschädigter und vergrößerter Mitochondrien konnte auch festgestellt werden. Zusätzlich waren die Mitochondrien nicht wie gewöhnlich zwischen den einzelnen Muskelfasern im intermyofibrillären Raum positioniert, sondern stattdessen unregelmäßig im gesamten Muskel und hauptsächlich in Randbereichen lokalisiert. Ebenso konnte eine subsarkolemmale Akkumulation von Glykogen beobachtet werden.

Es lässt sich also zusammenfassen, dass die Frage nach einer muskulären Störung und generellen Veränderungen der Muskulatur beim FMS schon eine lange Debatte nach sich zieht und kontrovers diskutiert wird. Autoren sind sich einig, dass lichtmikroskopische Läsionen geringfügig und nicht spezifisch sind. Elektronenmikroskopische Analysen hingegen zeigten auffällige Veränderungen, die sich vor allem an beschädigten Muskelfilamenten und Abnormitäten in mitochondrialer Form und Struktur festmachen ließen [122].

In der vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich Mausmuskeln der unteren Extremität untersucht, da diese bei der Maus stärker ausgeprägt sind als jene der oberen Extremität und damit eine Untersuchung besser möglich machen. Es ist erstaunlich, dass vor allem im Hinblick auf die elektronenmikroskopischen Auswertungen sehr kompatible Ergebnisse im Vergleich mit den Ergebnissen humaner Biopsien zu vernehmen waren. Dabei sind vor allen Dingen die mitochondrialen Defekte von ganz besonderer Bedeutung, nicht zuletzt, da Mitochondrien durch die ATP-Produktion den Großteil der Energie für eine Zelle bereitstellen und das FMS unter anderem durch frühzeitige Ermüdung der Muskulatur charakterisiert wird [118].



## 5.5. Bedeutung autophagischer Prozesse für das FMS und ihre Entstehung durch intermittierenden Kältestress

In den letzten Jahren haben sich Cordero *et al.* sehr intensiv mit der Pathogenese des FMS beschäftigt. Dabei hat sich die Arbeitsgruppe wie bereits beschrieben hauptsächlich mit molekularbiologischen Phänomenen hinsichtlich oxidativen Stresses beschäftigt. Allerdings konnten ebenso Strukturveränderungen der Mitochondrien festgestellt werden. Dabei wurde in mononukleären Blutzellen von Fibromyalgie-Patienten eine Degeneration von Mitochondrien beobachtet, die sich in einer Formveränderung und beschädigtem Zustand äußerte [59]. Diese Veränderungen der Mitochondrien sind kompatibel mit den bereits im vorherigen Abschnitt beschriebenen und von anderen Autoren in Muskelbiopsien von Patienten mit FMS beobachteten Phänomenen. Allerdings wurden von Cordero *et al.* zusätzlich sehr relevante neue Erkenntnisse gewonnen. 2010 wurde eine Studie veröffentlicht, in welcher mononukleäre Blutzellen von Fibromyalgie-Patienten eindeutige Muster autophagischer Prozesse aufwiesen. Somit konnten ultrastrukturell Autophagosomen festgestellt werden, die die beschädigten Mitochondrien mit ihrer Doppelmembran umfassten [58]. Mitochondriale Degeneration und Veränderungen wurden damit in den Blutzellen zweier Patienten mit FMS festgestellt und zusätzliche autophagische Prozesse in einigen Patienten aus einer Gruppe von insgesamt 20 FMS-Betroffenen im Vergleich mit einer Kontrollgruppe von 10 Personen. Hierbei muss also erwähnt werden, dass in beiden Studien eine relativ kleine Patientengruppe repräsentiert wurde. Interessanterweise konnten auch in dieser Arbeit elektronenmikroskopisch, neben den bereits beschriebenen Veränderungen der Mitochondrien, in einigen Präparaten dieselben autophagischen Phänomenen beobachtet werden, die Cordero *et al.* in seiner Arbeit beschrieben hat. Neben autophagischen Vakuolen konnte eine deutliche Autophagosomen-Formation mit Doppelmembranbildung festgestellt werden und deutet damit sichtlich auf ablaufende Autophagie/Mitophagie auch im Muskelgewebe von ICS-Mäusen hin.

Cordero *et al.* haben zusätzlich zu den elektronenmikroskopischen Analysen ebenso die Expression von zwei Genen untersucht, die für die Autophagie typische Parameter darstellen und auch in dieser Arbeit analysiert wurden. In der Studie von Cordero *et al.* zeigten 5 der 8 getesteten Patienten mit FMS eine erhöhte Expression von sowohl MAP1LC3B als auch BECN1 in mononukleären Blutzellen. Dabei wurde zusätzlich untersucht, wie die Expression dieser autophagischen Marker mit den COQ10-Werten korreliert. Hierbei stellte sich heraus, dass bei denjenigen Patienten, die die niedrigsten COQ10-Werte in den Blutzellen aufwiesen die benannten autophagischen Marker am höchsten exprimiert wurden [58]. In dieser Arbeit zeigte sich bei den ICS-Mäusen ebenfalls eine deutliche Überexpression von *Map1lc3b* und *Becn1* auf Transkriptionsebene. Da MAP1LC3B eine entscheidende Rolle in der Formation von Autophagosomen spielt und die Synthese und Verarbeitung während des Ablaufs

autophagischer Prozesse gesteigert ist, kann seine Bestimmung angeben, ob zur Zeit Autophagie in einer Zelle stattfindet [82, 83]. Vor allem die Tatsache, dass MAP1LC3B als einziges der Atg-Proteine in das lysosomale Kompartiment transportiert wird und dort weiter verarbeitet wird, ermöglicht diese Rückschlüsse. BECN1 ist ein regulatorisches Protein, welches unter anderem auch bei der Formation von Autophagosomen eine relevante Rolle spielt [123, 124]. Folglich ist die Expression beider Moleküle bei ablaufender Autophagie in einer Zelle gesteigert [69]. Eine direkte Korrelation zwischen MAP1LC3B- und BECN1-Expression und COQ10-Werten konnte vorliegend nicht gefunden werden. Allerdings zeigte sich, wie bereits beschrieben, bei den ICS-Mäusen eine Überexpression des *Coq10b*-Gens, welche auf einen Kompensationsmechanismus der Zelle hindeuten könnten. Für die vorliegende Arbeit wurde zusätzlich die Expression von MAP1LC3B sowie p62 auf Proteinebene mittels Western Blot analysiert. Dabei zeigte die ausschließliche Betrachtung der Western Blot-Banden für MAP1LC3B eine gleichbleibende Proteinexpression bei den männlichen und eine leicht erhöhte bei den weiblichen ICS-Mäusen. Für p62 hingegen zeigten die männlichen ICS-Mäuse ein verstärktes Bandenmuster, wohingegen die weiblichen ICS-Tiere ein konstantes Muster aufwiesen. Die densitometrischen Auswertungen ergaben für beide Gruppen der ICS-Mäuse eine unveränderte Expression von MAP1LC3B. Die p62-Proteinexpression zeigte densitometrisch für die männlichen ICS-Tiere eine erhöhte Expression, für die weiblichen ICS-Tiere hingegen erneut ein relativkonstantes bis leicht erhöhtes Expressionsmuster. Bei p62 hingegen handelt es sich um ein Adaptermolekül, welches die Degradation von ubiquiniertem Material vermittelt. Dementsprechend wird die Expression von p62 bei ablaufender Autophagie gesteigert, um eine schnellere Degradation zu ermöglichen [69]. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich dahingehend im Folgenden veranschaulichen.

Die erhöhte Expression von MAP1LC3B lässt sich damit erklären, dass bei ablaufender Autophagie der Bedarf dieses Moleküls steigt. Auf Proteinebene lassen sich ferner die konstante Expression damit erklären, dass gleichzeitig der Verbrauch von MAP1LC3B steigt und es damit zu einem erhöhten Umsatz kommt. Die erhöhte Expression von p62 auf Proteinebene ist ebenfalls eine logische Konsequenz aus dem entstehenden erhöhten Bedarf des für die Degradation notwendigen Adaptermoleküls [125, 126].

Aus der Literatur ist bekannt, dass der Gehalt an MAP1LC3B Aufschluss über das Ausmaß und die Anzahl von Autophagosomen liefert, da es in den Membranen dieser eingebaut wird und zu finden ist [127]. Hierzu passen auch die immunhistochemischen Analysen in dieser Arbeit, die eine deutliche punktuelle Aggregation von MAP1LC3B in den Präparaten der ICS-Mäuse aufzeigten. Diese Aggregation deutet auf das Vorhandensein von Autophagosomen hin und bietet neben dem molekularbiologischen und elektronenmikroskopischen Nachweis einen weiteren Anhaltspunkt für stattfindende Autophagie im Mausmuskul von ICS-Tieren.

Rosenfeldt *et al.* beschrieben ebenso bei einer punktuellen aggregatischen Färbung das Vorliegen von Autophagosomen als Anzeichen für Autophagie in einer Zelle und eine uniforme Färbung hingegen in Kontrollpräparaten [128]. Auch in der vorliegenden Arbeit zeigten die Präparate der unbehandelten Mäuse eine homogene Färbung mit MAP1LC3B, was folglich darauf schließen lässt, dass in den Mäusen, die keinem Kältestress ausgesetzt wurden, dementsprechend keine autophagischen Prozesse ablaufen.

## 5.6. Ausblick

Die vorliegende Studie deckt neue Aspekte auf, die metabolische und molekulare Veränderungen in C57BL/6J Mäusen als Reaktion auf intermittierenden Kältestress umfassen. Es ist dabei bemerkenswert, dass das ICS-Modell scheinbar sowohl auf den Stoffwechsel als auch auf morphologischer und molekularer Ebene spezifische Veränderungen auslöst, die mit den Veränderungen in humanen Proben und Muskelbiopsien korrelieren. Somit konnte auch in dieser Arbeit die wichtige Bedeutung von mitochondrialen Schäden und im weiteren Sinne Mitophagie für die Pathophysiologie des FMS herausgearbeitet werden.

In den letzten Jahren gab es einige Studien, die sich mit therapeutischen Optionen für das FMS beschäftigten. Dies lag vor allen Dingen auch daran, dass es an effektiven Therapiemöglichkeiten mangelt. Teilweise wurden sogar beim FMS verwendete Medikamente für die Zunahme oxidativen Stresses und mitochondrialer Dysfunktion verantwortlich gemacht [129]. Bei der Erforschung neuer Therapieoptionen, standen die Konsequenzen oxidativen Stresses im Vordergrund, die wie bereits erwähnt bei der Pathogenese eine wichtige Rolle einzunehmen.

In einer klinischen Pilotstudie führte die Verabreichung von antioxidativ wirksamen Vitamin C und E in Kombination mit Bewegungstherapie zu einer Besserung der Symptomatik und bestätigt daher noch einmal die Hypothese der mitochondrialen Dysfunktion in der Muskulatur[68]. In einer weiteren Studie konnte auch eine Korrelation zwischen weiteren antioxidativ wirkenden Substanzen wie Gluthation und der Schwere der Symptomatik bei Patienten mit FMS festgestellt werden [65].

Ebenso haben sich einige Arbeitsgruppen mit der therapeutischen Wirkung von COQ10 beschäftigt und konnten nachweisen, dass es bei Einsatz dieser Substanz zu einer Verbesserung der Lebensqualität von Patienten mit FMS kommt und vor allen Dingen auch kennzeichnende Symptome wie Erschöpfung und Müdigkeit reduziert werden [130-132].

Cordero *et al.* waren die ersten, die eine randomisierte, Doppelblind-Studie durchgeführt haben, in der sie 20 Fibromyalgie-Patienten über einen Zeitraum von 40 Tagen mit 300 mg/Tag COQ10 supplementiert haben. Diese Studie offenbarte erstaunliche Ergebnisse, die eine Reduktion des Schmerzes, der Ermüdung und der Morgensteifigkeit umfassten. Zusätzlich konnte eine Minderung der „*tender points*“ einschließlich einer Besserung der

mitochondrialen Biogenese und der Biogenese antioxidativer Enzyme beobachtet werden [133].

Diese Ergebnisse führen zur Hypothese, dass die Supplementierung von antioxidativ wirksamen Substanzen und in dieser Hinsicht vor allem auch COQ10 beim Menschen einen scheinbar therapeutischen Effekt in der Behandlung des FMS aufzeigen könnten.

Die Tatsache, dass die Gemeinsamkeiten zwischen Mausmodell und humaner Präsentation des FMS so groß sind, macht das ICS-Model für den weiteren therapeutischen Wissenszuwachs sehr wertvoll. Die Erprobung verschiedener Substanzen könnte weitere Erkenntnisse bereitlegen, die ein besseres Verständnis der Pathophysiologie ermöglicht und in Zukunft auch eine effektive Therapie dieses komplexen Krankheitsbildes ermöglicht.

## 6. Literaturverzeichnis

3. Aaron, L.A., M.M. Burke, and D. Buchwald, *Overlapping conditions among patients with chronic fatigue syndrome, fibromyalgia, and temporomandibular disorder*. Arch Intern Med, 2000. **160**(2): p. 221-7.
48. Ablin, J.N., Y. Shoenfeld, and D. Buskila, *Fibromyalgia, infection and vaccination: two more parts in the etiological puzzle*. J Autoimmun, 2006. **27**(3): p. 145-52.
64. Altindag, O. and H. Celik, *Total antioxidant capacity and the severity of the pain in patients with fibromyalgia*. Redox Rep, 2006. **11**(3): p. 131-5.
97. Arnarez, C., S.J. Marrink, and X. Periole, *Identification of cardiolipin binding sites on cytochrome c oxidase at the entrance of proton channels*. Sci Rep, 2013. **3**: p. 1263.
24. Arnold, L.M., et al., *Family study of fibromyalgia*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(3): p. 944-52.
12. Auvinet, B. and D. Chaleil, *Identification of subgroups among fibromyalgia patients*. Reumatismo, 2012. **64**(4): p. 250-60.
80. Axe, E.L., et al., *Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum*. J Cell Biol, 2008. **182**(4): p. 685-701.
109. Bagis, S., et al., *Free radicals and antioxidants in primary fibromyalgia: an oxidative stress disorder?* Rheumatol Int, 2005. **25**(3): p. 188-90.
41. Baraniuk, J.N., et al., *Cerebrospinal fluid levels of opioid peptides in fibromyalgia and chronic low back pain*. BMC Musculoskelet Disord, 2004. **5**: p. 48.
82. Barth, S., D. Glick, and K.F. Macleod, *Autophagy: assays and artifacts*. J Pathol, 2010. **221**(2): p. 117-24.
53. Battino, M., et al., *Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: the challenge of antioxidants to free radicals and reactive oxygen species*. Crit Rev Oral Biol Med, 1999. **10**(4): p. 458-76.
120. Bengtsson, A., K.G. Henriksson, and J. Larsson, *Muscle biopsy in primary fibromyalgia. Light-microscopical and histochemical findings*. Scand J Rheumatol, 1986. **15**(1): p. 1-6.
49. Bruce Alberts, A.J., Juian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, *Molecular Biology of the Cell* 1994: Garland Publishing Inc., New York.
9. Buskila, D. and L. Neumann, *Fibromyalgia syndrome (FM) and nonarticular tenderness in relatives of patients with FM*. J Rheumatol, 1997. **24**(5): p. 941-4.
25. Buskila, D., et al., *Familial aggregation in the fibromyalgia syndrome*. Semin Arthritis Rheum, 1996. **26**(3): p. 605-11.
45. Buskila, D., et al., *Fibromyalgia in human immunodeficiency virus infection*. J Rheumatol, 1990. **17**(9): p. 1202-6.
15. Carville, S.F., et al., *EULAR evidence-based recommendations for the management of fibromyalgia syndrome*. Ann Rheum Dis, 2008. **67**(4): p. 536-41.
132. Caso, G., et al., *Effect of coenzyme q10 on myopathic symptoms in patients treated with statins*. Am J Cardiol, 2007. **99**(10): p. 1409-12.
114. Castro-Marrero, J., et al., *Could mitochondrial dysfunction be a differentiating marker between chronic fatigue syndrome and fibromyalgia?* Antioxid Redox Signal, 2013. **19**(15): p. 1855-60.
66. Chung, C.P., et al., *Oxidative stress in fibromyalgia and its relationship to symptoms*. Clin Rheumatol, 2009. **28**(4): p. 435-8.
23. Clauw, D.J. and L.J. Crofford, *Chronic widespread pain and fibromyalgia: what we know, and what we need to know*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2003. **17**(4): p. 685-701.
4. Clauw, D.J., *Fibromyalgia: an overview*. Am J med, 2009. **122**(12 Suppl): p. S3-S13.
30. Cohen, H., et al., *Autonomic nervous system derangement in fibromyalgia syndrome and related disorders*. Isr Med Assoc J, 2001. **3**(10): p. 755-60.
21. Cohen, H., et al., *Prevalence of post-traumatic stress disorder in fibromyalgia patients: overlapping syndromes or post-traumatic fibromyalgia syndrome?* Semin Arthritis Rheum, 2002. **32**(1): p. 38-50.

133. Cordero, M.D., et al., *Can coenzyme q10 improve clinical and molecular parameters in fibromyalgia?* Antioxid Redox Signal, 2013. **19**(12): p. 1356-61.
67. Cordero, M.D., et al., *Clinical symptoms in fibromyalgia are better associated to lipid peroxidation levels in blood mononuclear cells rather than in plasma.* PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26915.
61. Cordero, M.D., et al., *Coenzyme Q(10): a novel therapeutic approach for Fibromyalgia? case series with 5 patients.* Mitochondrion, 2011. **11**(4): p. 623-5.
60. Cordero, M.D., et al., *Coenzyme Q10 in salivary cells correlate with blood cells in Fibromyalgia: improvement in clinical and biochemical parameter after oral treatment.* Clin Biochem, 2012. **45**(6): p. 509-11.
58. Cordero, M.D., et al., *Mitochondrial dysfunction and mitophagy activation in blood mononuclear cells of fibromyalgia patients: implications in the pathogenesis of the disease.* Arthritis Res Ther, 2010. **12**(1): p. R17.
59. Cordero, M.D., et al., *Mitochondrial dysfunction in skin biopsies and blood mononuclear cells from two cases of fibromyalgia patients.* Clin Biochem, 2010. **43**(13-14): p. 1174-6.
95. Cordero, M.D., et al., *Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in fibromyalgia.* Neuro Endocrinol Lett, 2010. **31**(2): p. 169-73.
18. Crofford, L.J., N.C. Engleberg, and M.A. Demitrack, *Neurohormonal perturbations in fibromyalgia.* Baillieres Clin Rheumatol, 1996. **10**(2): p. 365-78.
28. Crofford, L.J., *The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of rheumatic diseases.* Endocrinol Metab Clin North Am, 2002. **31**(1): p. 1-13.
5. D.L. Kasper, T.R.H., *Harrison's Principles of Internal Medicine.* 16th edition ed. "Fibromyalgia, arthritis associated with systemic disease, and other arthritides", ed. B.C. Gilliland. Vol. vol.2. 2005, New York, USA: McGraw-Hill, Medical Publication Division
123. Diaz-Troya, S., et al., *The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals.* Autophagy, 2008. **4**(7): p. 851-65.
52. DiMauro, S., C.M. Quinzii, and M. Hirano, *Mutations in coenzyme Q10 biosynthetic genes.* J Clin Invest, 2007. **117**(3): p. 587-9.
46. Dinerman, H. and A.C. Steere, *Lyme disease associated with fibromyalgia.* Ann Intern Med, 1992. **117**(4): p. 281-5.
102. Dörner, K., *Taschenlehrbuch: Klinische Chemie und Hämatologie.* Vol. 9. Auflage. 2009, Kiel: Thieme.
36. Dubner, R. and K.M. Hargreaves, *The neurobiology of pain and its modulation.* Clin J Pain, 1989. **5 Suppl 2**: p. S1-4; discussion S4-6.
94. Eisinger, J., A. Plantamura, and T. Ayavou, *Glycolysis abnormalities in fibromyalgia.* J Am Coll Nutr, 1994. **13**(2): p. 144-8.
20. Epstein, S.A., et al., *Psychiatric disorders in patients with fibromyalgia. A multicenter investigation.* Psychosomatics, 1999. **40**(1): p. 57-63.
10. Fitzcharles, M.A. and P. Boulos, *Inaccuracy in the diagnosis of fibromyalgia syndrome: analysis of referrals.* Rheumatology (Oxford), 2003. **42**(2): p. 263-7.
108. Frye, C.A., *Progesterone attenuates depressive behavior of younger and older adult C57/BL6, wildtype, and progesterone receptor knockout mice.* Pharmacol Biochem Behav, 2011. **99**(4): p. 525-31.
131. Fu, X., R. Ji, and J. Dam, *Antifatigue effect of coenzyme Q10 in mice.* J Med Food, 2010. **13**(1): p. 211-5.
62. Fulle, S., et al., *Specific oxidative alterations in vastus lateralis muscle of patients with the diagnosis of chronic fatigue syndrome.* Free Radic Biol Med, 2000. **29**(12): p. 1252-9.
29. Furlan, R., et al., *Abnormalities of cardiovascular neural control and reduced orthostatic tolerance in patients with primary fibromyalgia.* J Rheumatol, 2005. **32**(9): p. 1787-93.
113. Garrabou, G., et al., *Reversible inhibition of mitochondrial protein synthesis during linezolid-related hyperlactatemia.* Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(3): p. 962-7.
51. Gaziev, A.I., S. Abdullaev, and A. Podlitsky, *Mitochondrial function and mitochondrial DNA maintenance with advancing age.* Biogerontology, 2014.

19. Giesecke, T., et al., *Subgrouping of fibromyalgia patients on the basis of pressure-pain thresholds and psychological factors*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(10): p. 2916-22.
69. Glick, D., S. Barth, and K.F. Macleod, *Autophagy: cellular and molecular mechanisms*. J Pathol, 2010. **221**(1): p. 3-12.
14. Goldenberg, D.L., *Pharmacological treatment of fibromyalgia and other chronic musculoskeletal pain*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2007. **21**(3): p. 499-511.
93. Gostimskaya, I. and A. Galkin, *Preparation of highly coupled rat heart mitochondria*. J Vis Exp, 2010(43).
47. Greenfield, S., M.A. Fitzcharles, and J.M. Esdaile, *Reactive fibromyalgia syndrome*. Arthritis Rheum, 1992. **35**(6): p. 678-81.
96. Haas, R.H., et al., *The in-depth evaluation of suspected mitochondrial disease*. Mol Genet Metab, 2008. **94**(1): p. 16-37.
78. Hara, T., et al., *Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice*. Nature, 2006. **441**(7095): p. 885-9.
42. Harris, R.E., et al., *Decreased central mu-opioid receptor availability in fibromyalgia*. J Neurosci, 2007. **27**(37): p. 10000-6.
13. Hauser, W., K. Thieme, and D.C. Turk, *Guidelines on the management of fibromyalgia syndrome - a systematic review*. Eur J Pain, 2010. **14**(1): p. 5-10.
50. <http://www.biokurs.de/skripten/12/bs12-23.htm>
7. <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/fibromyalgia/multimedia/tender-points/img-20007586>.
106. Joachim Rassow, K.H., Roland Netzker, Rainer Deutzmann, *Duale Reihe- Biochemie*. Vol. 2.Auflage. 2008: Thieme, 2008.
127. Kabeya, Y., et al., *LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing*. EMBO J, 2000. **19**(21): p. 5720-8.
119. Kalyan-Raman, U.P., et al., *Muscle pathology in primary fibromyalgia syndrome: a light microscopic, histochemical and ultrastructural study*. J Rheumatol, 1984. **11**(6): p. 808-13.
79. Kang, R., et al., *The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis*. Cell Death Differ, 2011. **18**(4): p. 571-80.
90. Kim, I., S. Rodriguez-Enriquez, and J.J. Lemasters, *Selective degradation of mitochondria by mitophagy*. Arch Biochem Biophys, 2007. **462**(2): p. 245-53.
99. Kirisako, T., et al., *Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast*. J Cell Biol, 1999. **147**(2): p. 435-46.
72. Klionsky, D.J., *Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(11): p. 931-7.
84. Koike, M., et al., *Participation of autophagy in storage of lysosomes in neurons from mouse models of neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease)*. Am J Pathol, 2005. **167**(6): p. 1713-28.
70. Komatsu, M. and Y. Ichimura, *Selective autophagy regulates various cellular functions*. Genes Cells, 2010. **15**(9): p. 923-33.
77. Komatsu, M., et al., *Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice*. Nature, 2006. **441**(7095): p. 880-4.
35. Kosek, E. and P. Hansson, *Modulatory influence on somatosensory perception from vibration and heterotopic noxious conditioning stimulation (HNCS) in fibromyalgia patients and healthy subjects*. Pain, 1997. **70**(1): p. 41-51.
124. Kundu, M., et al., *Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation*. Blood, 2008. **112**(4): p. 1493-502.
112. La Rubia, M., et al., *Is fibromyalgia-related oxidative stress implicated in the decline of physical and mental health status?* Clin Exp Rheumatol, 2013. **31**(6 Suppl 79): p. S121-7.
118. Le Goff, P., *Is fibromyalgia a muscle disorder?* Joint Bone Spine, 2006. **73**(3): p. 239-42.
98. Lee, J., S. Giordano, and J. Zhang, *Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling*. Biochem J, 2012. **441**(2): p. 523-40.



89. Lemasters, J.J., et al., *The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1366**(1-2): p. 177-96.
44. Leventhal, L.J., S.J. Nades, and B. Freundlich, *Fibromyalgia and parvovirus infection*. Arthritis Rheum, 1991. **34**(10): p. 1319-24.
125. Lin, X., et al., *Interaction domains of p62: a bridge between p62 and selective autophagy*. DNA Cell Biol, 2013. **32**(5): p. 220-7.
130. Lister, R.E., *An open, pilot study to evaluate the potential benefits of coenzyme Q10 combined with Ginkgo biloba extract in fibromyalgia syndrome*. J Int Med Res, 2002. **30**(2): p. 195-9.
54. Littarru, G.P. and L. Tiano, *Clinical aspects of coenzyme Q10: an update*. Nutrition, 2010. **26**(3): p. 250-4.
38. Malt, E.A., et al., *Altered dopamine D2 receptor function in fibromyalgia patients: a neuroendocrine study with buspirone in women with fibromyalgia compared to female population based controls*. J Affect Disord, 2003. **75**(1): p. 77-82.
27. Martorell, L., et al., *Screening for the presence of FMR1 premutation alleles in a Spanish population with fibromyalgia*. Clin Rheumatol, 2012. **31**(11): p. 1611-5.
22. McBeth, J., et al., *Features of somatization predict the onset of chronic widespread pain: results of a large population-based study*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(4): p. 940-6.
111. Meeus, M., et al., *The role of mitochondrial dysfunctions due to oxidative and nitrosative stress in the chronic pain or chronic fatigue syndromes and fibromyalgia patients: peripheral and central mechanisms as therapeutic targets?* Expert Opin Ther Targets, 2013. **17**(9): p. 1081-9.
75. Mizushima, N. and M. Komatsu, *Autophagy: renovation of cells and tissues*. Cell, 2011. **147**(4): p. 728-41.
81. Mizushima, N., *Autophagy: process and function*. Genes Dev, 2007. **21**(22): p. 2861-73.
83. Mizushima, N., T. Yoshimori, and B. Levine, *Methods in mammalian autophagy research*. Cell, 2010. **140**(3): p. 313-26.
129. Moreno-Fernandez, A.M., et al., *Oral treatment with amitriptyline induces coenzyme Q deficiency and oxidative stress in psychiatric patients*. J Psychiatr Res, 2012. **46**(3): p. 341-5.
85. Moscat, J. and M.T. Diaz-Meco, *p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer*. Cell, 2009. **137**(6): p. 1001-4.
86. Moscat, J., M.T. Diaz-Meco, and M.W. Wooten, *Signal integration and diversification through the p62 scaffold protein*. Trends Biochem Sci, 2007. **32**(2): p. 95-100.
71. Nakatogawa, H., et al., *Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(7): p. 458-67.
68. Naziroglu, M., et al., *Vitamins C and E treatment combined with exercise modulates oxidative stress markers in blood of patients with fibromyalgia: a controlled clinical pilot study*. Stress, 2010. **13**(6): p. 498-505.
105. Nelson, P.T. and J.N. Keller, *RNA in brain disease: no longer just "the messenger in the middle"*. J Neuropathol Exp Neurol, 2007. **66**(6): p. 461-8.
100. Nishiyori, M. and H. Ueda, *Prolonged gabapentin analgesia in an experimental mouse model of fibromyalgia*. Mol Pain, 2008. **4**: p. 52.
92. Nishiyori, M., et al., *Absence of morphine analgesia and its underlying descending serotonergic activation in an experimental mouse model of fibromyalgia*. Neurosci Lett, 2010. **472**(3): p. 184-7.
63. Ozgocmen, S., et al., *Antioxidant status, lipid peroxidation and nitric oxide in fibromyalgia: etiologic and therapeutic concerns*. Rheumatol Int, 2006. **26**(7): p. 598-603.
110. Ozgocmen, S., et al., *Current concepts in the pathophysiology of fibromyalgia: the potential role of oxidative stress and nitric oxide*. Rheumatol Int, 2006. **26**(7): p. 585-97.
88. Pankiv, S., et al., *p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy*. J Biol Chem, 2007. **282**(33): p. 24131-45.
107. Park, J.H., K.J. Niermann, and N. Olsen, *Evidence for metabolic abnormalities in the muscles of patients with fibromyalgia*. Curr Rheumatol Rep, 2000. **2**(2): p. 131-40.



73. Patricia Boya, P.C., *Autophagy: Molecular Mechanisms, Physiology and Pathology*, in *Tocris Bioscience Scientific Review Series* 2012.
40. Pillemer, S.R., et al., *The neuroscience and endocrinology of fibromyalgia*. *Arthritis Rheum*, 1997. **40**(11): p. 1928-39.
122. Pongratz, D.E. and M. Spath, *Morphologic aspects of fibromyalgia*. *Z Rheumatol*, 1998. **57 Suppl 2**: p. 47-51.
116. Quinzii, C.M., et al., *Respiratory chain dysfunction and oxidative stress correlate with severity of primary CoQ10 deficiency*. *FASEB J*, 2008. **22**(6): p. 1874-85.
115. Rauchova, H., et al., *Coenzyme Q-pool function in glycerol-3-phosphate oxidation in hamster brown adipose tissue mitochondria*. *J Bioenerg Biomembr*, 1992. **24**(2): p. 235-41.
74. Reggiori, F. and D.J. Klionsky, *Autophagic processes in yeast: mechanism, machinery and regulation*. *Genetics*, 2013. **194**(2): p. 341-61.
43. Rivera, J., et al., *Fibromyalgia-associated hepatitis C virus infection*. *Br J Rheumatol*, 1997. **36**(9): p. 981-5.
91. Rodriguez-Hernandez, A., et al., *Coenzyme Q deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy*. *Autophagy*, 2009. **5**(1): p. 19-32.
128. Rosenfeldt, M.T., et al., *Analysis of macroautophagy by immunohistochemistry*. *Autophagy*, 2012. **8**(6): p. 963-9.
37. Russell, I.J., et al., *Cerebrospinal fluid biogenic amine metabolites in fibromyalgia/fibrositis syndrome and rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1992. **35**(5): p. 550-6.
2. Schneider, M.J., D.M. Brady, and S.M. Perle, *Commentary: differential diagnosis of fibromyalgia syndrome: proposal of a model and algorithm for patients presenting with the primary symptom of chronic widespread pain*. *J Manipulative Physiol Ther*, 2006. **29**(6): p. 493-501.
87. Seibenhener, M.L., et al., *Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(18): p. 8055-68.
65. Sendur, O.F., et al., *Serum antioxidants and nitric oxide levels in fibromyalgia: a controlled study*. *Rheumatol Int*, 2009. **29**(6): p. 629-33.
104. Shabalina, I.G., et al., *Carboxyatractyloside effects on brown-fat mitochondria imply that the adenine nucleotide translocator isoforms ANT1 and ANT2 may be responsible for basal and fatty-acid-induced uncoupling respectively*. *Biochem J*, 2006. **399**(3): p. 405-14.
1. Sim, J. and S. Madden, *Illness experience in fibromyalgia syndrome: a metasynthesis of qualitative studies*. *Soc Sci Med*, 2008. **67**(1): p. 57-67.
101. Sluka, K.A., *Is it possible to develop an animal model of fibromyalgia?* *Pain*, 2009. **146**(1-2): p. 3-4.
55. Sprott, H., et al., *Increased DNA fragmentation and ultrastructural changes in fibromyalgic muscle fibres*. *Ann Rheum Dis*, 2004. **63**(3): p. 245-51.
33. Staud, R. and M.L. Smitherman, *Peripheral and central sensitization in fibromyalgia: pathogenetic role*. *Curr Pain Headache Rep*, 2002. **6**(4): p. 259-66.
34. Staud, R., et al., *Temporal summation of pain from mechanical stimulation of muscle tissue in normal controls and subjects with fibromyalgia syndrome*. *Pain*, 2003. **102**(1-2): p. 87-95.
31. Stisi, S., et al., *Etiopathogenetic mechanisms of fibromyalgia syndrome*. *Reumatismo*, 2008. **60 Suppl 1**: p. 25-35.
117. Tan, M.L., I. Balabin, and J.N. Onuchic, *Dynamics of electron transfer pathways in cytochrome C oxidase*. *Biophys J*, 2004. **86**(3): p. 1813-9.
17. Thieme, K. and R.H. Gracely, *Are psychological treatments effective for fibromyalgia pain?* *Curr Rheumatol Rep*, 2009. **11**(6): p. 443-50.
11. Toda, K., *Preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia should be partially revised: comment on the article by Wolfe et al*. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2011. **63**(2): p. 308-9; author reply 309-10.
57. Turunen, M., J. Olsson, and G. Dallner, *Metabolism and function of coenzyme Q*. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1660**(1-2): p. 171-99.
16. Vlaeyen, J.W., et al., *Cognitive-educational treatment of fibromyalgia: a randomized clinical trial. I. Clinical effects*. *J Rheumatol*, 1996. **23**(7): p. 1237-45.

8. W. Häuser, B.A., J. Bär, W. Eich, R. Häfner, P. Henningsen, A. Winkelmann, C. Sommer, M. Schiltenswolf, K. Thieme, *Definition, Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie des Fibromyalgiesyndroms*, 2012.
126. White, E., *Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(6): p. 401-10.
26. Winarni, T.I., et al., *Immune-mediated disorders among women carriers of fragile X premutation alleles*. Am J Med Genet A, 2012. **158A**(10): p. 2473-81.
6. Wolfe, F., et al., *The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee*. Arthritis Rheum, 1990. **33**(2): p. 160-72.
39. Wood, P.B., *Stress and dopamine: implications for the pathophysiology of chronic widespread pain*. Med Hypotheses, 2004. **62**(3): p. 420-4.
76. Yang, Z. and D.J. Klionsky, *Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation*. Curr Opin Cell Biol, 2010. **22**(2): p. 124-31.
103. Yoshida, Y., et al., *Negligible direct lactate oxidation in subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria obtained from red and white rat skeletal muscle*. J Physiol, 2007. **582**(Pt 3): p. 1317-35.
121. Yunus, M.B., et al., *Electron microscopic studies of muscle biopsy in primary fibromyalgia syndrome: a controlled and blinded study*. J Rheumatol, 1989. **16**(1): p. 97-101.
56. Yunus, M.B., et al., *Pathologic changes in muscle in primary fibromyalgia syndrome*. Am J med, 1986. **81**(3A): p. 38-42.
32. Yunus, M.B., *Towards a model of pathophysiology of fibromyalgia: aberrant central pain mechanisms with peripheral modulation*. J Rheumatol, 1992. **19**(6): p. 846-50.

## 7. Verzeichnis der akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren in Gießen die Damen/Herren:

Acker, Bein, Bödeker, Böning, Chakraborty, Deinzer, Dettmeyer, Eikmann, Gallhofer, Gattenlöhner, Gieler, Göttlich, Grimminger, Hamm, Howaldt, Kaps Klußmann, Kracht, Krombach, Kruse, Kummer, Lorenz, Müller, Neubauer, Novotny, Padberg, Reiter, Renz, Rickert, Roelcke, Schäffler, Seeger, Schmitz, Schneider, Schnettler, Schranz, Tinneberg, Uhl, Weidner, Weigand, Ziebuhr, Zimmer

## 8. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. med. Matthias Ocker für die Vergabe des Themas und die hervorragende Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit. Prof. Ocker hat durch seinen Weitblick und seine Begeisterung für das wissenschaftliche Arbeiten meinen Horizont erweitert und mich stetig motiviert für meine Träume zu kämpfen. Seine Tür stand immer offen und selbst zuletzt hat ihn die räumliche Distanz nie davon abgehalten sich allen Fragen und Problemen anzunehmen und zu lösen. Er hat mich stets unterstützt, wo er nur konnte. Vielen, vielen Dank dafür.

Bei Frau Prof. Dr. med. Susanne Fuchs- Winkelmann und den Kollegen aus der Orthopädie möchte ich mich auch ganz herzlich für jede Unterstützung bedanken. Besonders gebührt mein Dank Dr.rer. nat. Jürgen Paletta und Dr. med. Karl-Friedrich Schüttler für die tatkräftige Unterstützung und Betreuung während der Experimente.

Dr. Pietro Di Fazio danke ich besonders für die Unterstützung während der letzten Monate. Er war als einzig verbliebener der Arbeitsgruppe stets mein Ansprechpartner bei allen Fragen und Problemen und immer sehr hilfsbereit und hat geholfen wo er nur konnte.

Bei den Kollegen aus der Anatomie bedanke ich mich auch sehr herzlich. Prof. Dr. sc. hum. Ralf Kinscherf danke ich für die Kooperation bei diesem Projekt. Besonders Herrn Dr.rer. nat. Gabriel Bonaterra, Irmgard Damms Häuser und Michael Dreher gebührt mein Dank, da ihre Erfahrung und Unterstützung die Tierversuche erst ermöglichten.

Den Kollegen aus dem anatomischen Institut in Erlangen und darunter vor allem Dr. med. Samir Jabari, möchte ich ebenfalls für die Unterstützung, vor allen Dingen bei der Anfertigung von elektronenmikroskopischen Bildern sehr danken.

Bei Frau Prof. Dr. med. Kati Thieme möchte ich mich auch gerne für die Kooperation und die Bereicherung des Projekts durch gute Ideen bedanken.

Bei dem Institut für Pathologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Roland Moll bedanke ich mich sehr für die Unterstützung bei allen histologischen Angelegenheiten. Vor allem gebührt mein Dank Viktoria Wischmann für ihre zuverlässige und ständige Unterstützung.

Ich möchte mich an dieser Stelle auch herzlich bei den technischen Assistentinnen Susanne Lingelbach und Petra Waldegger bedanken. Sie haben durch Ihre Erfahrung und ständige Hilfestellung die Durchführung dieses Projektes erst möglich gemacht.

Meinen Mitdoktoranden gilt ebenfalls mein besonderer Dank. Durch die unterschiedliche Herangehensweise an verschiedene Probleme konnten wir uns gegenseitig stets Hilfestellung leisten.

Meinen gesamten Studienkollegen in Gießen und Marburg gilt natürlich auch mein Dank für das schöne Studentenleben in den letzten 6 Jahren.

Meiner guten Freundin Elena, danke ich für die schöne Zeit, als wir beide an unseren Doktorarbeiten geschrieben haben. Das stundenlange Zusammensitzen und gegenseitige motivieren haben die Zeit zu etwas ganz Besonderem gemacht und wir hatten immer sehr viel Spaß.

Meiner guten Freundin Kristin danke ich sehr, da sie immer an mich geglaubt hat und mir bei Fragen oder auch nur Beschwerden immer zur Seite stand und ein offenes Ohr hatte.

Nun zu Piggeldy und Frederick: Anna Lena, ohne Dich wäre diese Arbeit niemals zustande gekommen. Du hieltst mich nicht nur davon ab, dass Labor in die Luft zu jagen, vielmehr hast du mich als „Motivase“ immer wieder vor etlichen Weltuntergängen bewahrt. Ich danke Dir von Herzen für Deine tatkräftige Unterstützung, dass Du mich immer wieder angespornt hast, bis zum Ende mit mir durchgehalten hast und immer an mich geglaubt hast. Danke, dass du immer gesagt hast: „Nichts leichter als das, komm mit.“ Danke, dass du mir die „Laborwelt“ erklärt hast.

Zuletzt gebührt mein ganz besonderer Dank meiner gesamten Familie. Nur durch die Unterstützung meiner Mutter und meiner Brüder wurde mir dieses Studium ermöglicht. Sie haben die ständigen Hochs und Tiefs während der Erstellung dieser Arbeit mit durchlebt und standen mir immer geduldig an allen Ecken und Enden zur Seite. Danke Daniel, Jak und Adrian. Danke Mama.

